



ANNEE 2013 THESE : 2013 – TOU 3 – 4075

LE STATUT EN OLIGO-ÉLÉMENT CHEZ LE CHIEN SAIN : LE CUIVRE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

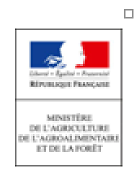
VANÇON Solène
Née, le 4 Avril 1988 à MONT DE MARSAN (40)

Directeur de thèse : Mme Nathalie PRIYMENKO

JURY

PRESIDENT :
M. Claude MOULIS Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURS :
Mme Nathalie PRIYMENKO Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Mme Lydie BRET-BENNIS Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE







Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Fôret
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. **A. MILON**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M **DELVERDIER Maxence,** *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François,** *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE** Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*

Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise***, Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît***, Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine***, Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle***, Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène***, Microbiologie-Pathologie infectieuse*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude***, Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc***, Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel***, Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud,** *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni***, Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent,** *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie***, Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie***, Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle,** *Alimentation*
M. **VOLMER Romain***, Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick***, Anesthésie, Réanimation*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent,** *Microbiologie et infectiologie*

Mme **FERNANDEZ Laura,** *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel***, Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie***, Médecine Interne*
M **VERSET Michaël***, Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le professeur MOULIS
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Qui nous a fais l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Avec toute ma gratitude, hommages respectueux

A Madame le Docteur Nathalie Priymenko
Maitre de conférences a l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Alimentation

Qui m'a accompagné tout au long de la réalisation de cette thèse. Merci pour votre disponibilité, votre patience, votre gentillesse et votre perpétuelle bonne humeur,
Très sincères remerciements.

A Madame le Docteur Lydie BRET-BENNIS
Maitre de conférences a l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Physique et Chimie biologiques et médicales

Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury,
Sincère reconnaissance

A Madame le Docteur Petra Rouch-Buck
Docteur en médecine vétérinaire IRPH
Merci pour votre aide précieuse et votre implication dans ce travail,
Qu'elle reçoive ici ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements

A Monsieur le Docteur Vincent Blanchart
Merci pour votre aide, votre gentillesse et vos topos perpétuels,
Qu'il reçoive ici ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements

A Amélie et framboise
ASV de l'école vétérinaire de Toulouse
Pour votre pédagogie, votre implication et votre bonne humeur
Merci de m'avoir accompagné durant toute cette année

A Madame Marie-Luce Chemit
Pour son travail de qualité,
Sincères remerciements

Et surtout un grand GRAND merci à tous les chiens (et leurs propriétaires) qui ont participés à cette étude.

A la clinique vétérinaire des arènes

A Madame le Docteur Sabine Arbouille

Pour m'avoir encouragé et guidé tous au long de ces années, pour m'avoir toujours considéré comme ton égal et pour ton amitié qui m'est chère,
Sincères remerciements

A Monsieur le Docteur Nicolas Vicart

Pour m'avoir accueillie à la clinique dès mon plus jeune âge et encore aujourd'hui,
Sincères remerciements

A Monsieur le Docteur Pierre Marot

Pour ta gentillesse et ta bonne humeur
Sincères remerciements

A Joelle, Vanessa et Karene, car travailler avec vous est un plaisir.

A toutes les autres cliniques qui m'ont accueillies au fil de ces années, et tout particulièrement à Monsieur le **Docteur Marambat et sa femme**, à **Madame le Docteur Besombes** et au **Docteur Anselme**, pour votre gentillesse, sincères remerciements.

A mes parents,

Merci de m’avoir toujours accompagné et poussé à réaliser mes rêves, c’est grâce à vous si j’en suis là aujourd’hui. Pour votre amour et votre patience (car je sais que je ne suis pas facile tous les jours, surtout avec toi papa), et pour avoir fait de moi la personne que je suis aujourd’hui, merci.

A mes frères,

Merci de m’accompagner et de mettre autant de sourire dans ma vie. Pour toutes vos citations de film, pour les soirées jeux endiablées et parce que vous êtes et serez toujours là pour moi, et m’avais toujours soutenu quoi qu’il arrive (même quand c’était difficile, même si les brebis se sont parfois égarée elles sont toujours revenues au troupeau), merci.

A mes grands parents,

Que j’espère pouvoir remercier encore longtemps

A tous mes amis,

Merci de faire partie de ma vie et de la rendre plus belle chaque jour…

A Katy,

Pour ton amitié à toute épreuve, pour notre voyage au Cambodge et pour les prochains à venir. Parce que les plus belles amitiés sont celles qui perdurent malgré la distance et que le temps n’effacera jamais.

A Franck,

Pour toutes nos soirées, tous ces rocks et pour tous ces sourires. Pour tous ces souvenirs que l’on s’est créé et tous les prochains à venir.

A Amélie,

Pour la danse et pour tous ces moments partagés… et puis pour les feux de l’amour aussi.

A Isabelle,

Pour les soirées cinéclub, pour les karaokés et pour être rester fidèle à ce que tu es tous au long de ces années : une princesse.

A Auréline,

Pour ton rire de clé à molette, pour les futurs bébés d’Ayan (peut-être un jour) et pour les petits repas top chef.

A Carole,

Pour les heures de correction de médecine, pour ta force intérieure que j'admire et pour tous les fous rires. Malgré la distance tu garderas toujours une grande place dans mon cœur.

A Paul,

Pour ta gentillesse, ton humour que j'adore et ta bonne humeur perpétuelle. (Après ça interdiction formelle de me soulever la jupe.. plus JAMAIS !)

A Tiffany,

Pour toutes ces boums et pour avoir toujours le sourire.

A Amandine,

Pour toutes ces boumettes endiablées et pour ta joie de vivre.

A Audrey,

Pour tes crêpes et autres petits plats à tomber….

A Anne-lise,

Pour ta gentillesse et ta modestie.

A François Lenfant,

Pour ces boumettes, pour ta bonne humeur toujours constante, pour être le DJ de nos soirées et surtout pour LA chanson.

A Marine et Hélène, mes amies de toujours

Pour avoir toujours garder une place pour moi dans vos vies malgré la distance.

A mes petits poulots, **Adeline, Charlotte, Lucas, Maxime, Alysée(s)** parce que vous êtes les meilleurs.

A tous les poulots des autres que j'aime quand même, **Patard** (Hermès nooonnn), **Corentin** (et **julie**), **Marie Bartoli, Fanny, Josselin, Albertini**.

A **Fabien**,

Pour avoir fais un bout de chemin avec moi. J'espère sincèrement que tu sauras être heureux.

A tous ceux que je n'ai pas cités mais auquel je pense, soyez remercié ici.

A tous ceux auquel je ne pense pas forcement mais qui ont fait partie de ma vie et on contribués à faire de moi la personne que je suis, soyez remerciés également.

TABLE DES MATIERES

Abbreviations

hCtr1 = Human Copper Transporter

COMMD1 = Copper Metabolism gene MURR1 containing Domain 1

XIAP = X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

MTF-1 = Metal-responsive element binding Transcription Factor-1

CCS = the Copper Chaperone for SOD1

Atox 1 = Antioxydant protein 1

SOD = superoxyde dismutase

DMT1 = Divalent Metal Transporter 1

NRAMP = Natural Resistance Associated Macrophage Protein

DCT1 = Divalent Cation Transporter 1

Tables des illustrations

Table des Figures

Table des tableaux

INTRODUCTION

Le cuivre est un métal essentiel à la vie, c'est un oligo-élément. De multiples enzymes, impliquées dans la synthèse de neurotransmetteurs, dans la formation du tissu conjonctif ou bien encore dans la chaine respiratoire l'utilisent comme cofacteur. De ce fait, tout déficit, entrainant un mauvais fonctionnement voire une inactivation de ces enzymes, est délétère. Le cuivre peut cependant s'avérer toxique lorsqu'il est présent en trop forte quantité : ses propriétés d'oxydoréduction peuvent générer des radicaux libres ayant des conséquences dramatiques pour la cellule [1] . Ainsi, l'homéostasie du cuivre est primordiale pour permettre le maintien de la cellule dans des conditions optimales.

Chez l'homme, les normes physiologiques, leurs facteurs de variations ainsi que les liés à ce minéral sont bien connues. En revanche, chez le chien, il y a très peu d'études sur ce sujet. Pourtant, des signes dermatologiques (squames, changement de couleur du poil) peuvent être rencontrés lorsque l'homéostasie cuprique est modifiée, mais aucun moyen n'est disponible à l'heure actuelle pour en connaître l'incidence et le diagnostiquer, chez le chien et le chat.

Ce travail, a eu pour but, dans un premier temps, de faire le point sur le métabolisme cuprique et son homéostasie, ainsi que sur les facteurs de variations identifiés chez l'homme.

Dans un deuxième temps, une étude expérimentale a été menée chez le chien afin de déterminer la cuprémie chez le chien sain présenté en consultation de médecine préventive à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Le deuxième but de cette étude a été d'établir des liens possibles entre certains facteurs épidémiologiques et les variations de concentration en cuivre dans le plasma, afin de pouvoir éventuellement définir des profils à risque de perturbation cuprique. Ainsi, dans ce travail, ont été étudiés des facteurs biologiques comme l'âge, le sexe, la stérilisation, la race et la couleur du poil, mais aussi des facteurs environnementaux tels que le style de vie, l'alimentation et l'activité physique.

PARTIE I : LE CUIVRE CHEZ LE CHIEN ET CHEZ L'HOMME : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le métabolisme du cuivre

La connaissance précise du métabolisme du cuivre permet une meilleure compréhension des mécanismes d'action intervenant lors de variations de la concentration cuprique. Nous allons détailler les étapes clefs du métabolisme cuprique telles que l'absorption du cuivre, son utilisation ou encore son élimination. Nous verrons également par quels mécanismes la concentration en cuivre est finement régulée, et enfin, nous nous intéresserons au métabolisme du cuivre lors de la gestation et de la lactation.

A. De l'alimentation au foie

1. L'absorption

Le cuivre est apporté par l'alimentation. Un homme ingère en moyenne 2.5 mg de cuivre par jour, dont 30 à 70% est absorbé. Les recommandations d'apport journalier varient, mais il existe un consensus autour de l'apport nécessaire de 0.9 à 2.2mg *in toto* chez l'adulte [2-10].

Le cuivre est ingéré sous forme de sels (sulfate de cuivre, oxyde de cuivre, etc..) et est en partie solubilisé dans l'estomac. Il se retrouve alors libre sous forme Cu^{2+} et arrive dans le duodénum où il est réduit sous forme Cu^{1+} et absorbé [2] (Figure 1).

Il rentre dans les entérocytes par deux mécanismes :

- grâce à un transporteur saturable et ayant une haute affinité pour le cuivre : le « human copper transporter 1» (hCtr1) [3]. Ce transporteur permet l'absorption de Cu^{+} lorsque la concentration en cuivre dans les entérocytes est faible [4;12-14]. Il est présent dans toutes les cellules de l'organisme [5].

- via une diffusion passive à travers la bordure en brosse, qui est prédominante lorsque la concentration en cuivre dans les entérocytes est forte [5].

Un autre transporteur de métaux, le « Divalent Metal transporter 1 » (DMT1), aussi connu sous le nom de « Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2» (Nramp2) et de « Divalent Cation Transporter 1 » (DCT1)), pourrait également jouer un rôle dans l'absorption du cuivre de manière non spécifique. Il a été démontré que DMT1 assure le passage du fer dans les entérocytes par un processus couplant le transport de protons. Son rôle pour le cuivre reste incertain [6].

2. Dans les entérocytes

Arrivé dans le secteur intracellulaire, le cuivre se fixe à des molécules chaperonnes : Hah1 (également appelée « Antioxydant protein 1 » (Atox1)). Chaque Hah1 lie une molécule

unique de cuivre [7]. Ces molécules chaperonnes acheminent le cuivre jusqu'à l'ATP7A, une ATPase de type P (Il existe différents types d'ATPases, le type P correspondant aux ATPases permettant le passage d'ions au travers d'une membrane contre leur gradient de concentration) qui assure le passage du cuivre dans l'appareil de Golgi en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP [1,8]. L'ATP7A est présente dans le trans-Golgi de tous les tissus à l'exception du foie [9].

Le cuivre est ensuite excrété dans la veine porte où il se lie à de petites molécules comme l'albumine, la transcupréine et l'histidine qui l'amènent jusqu'au foie [1,4,9-12]

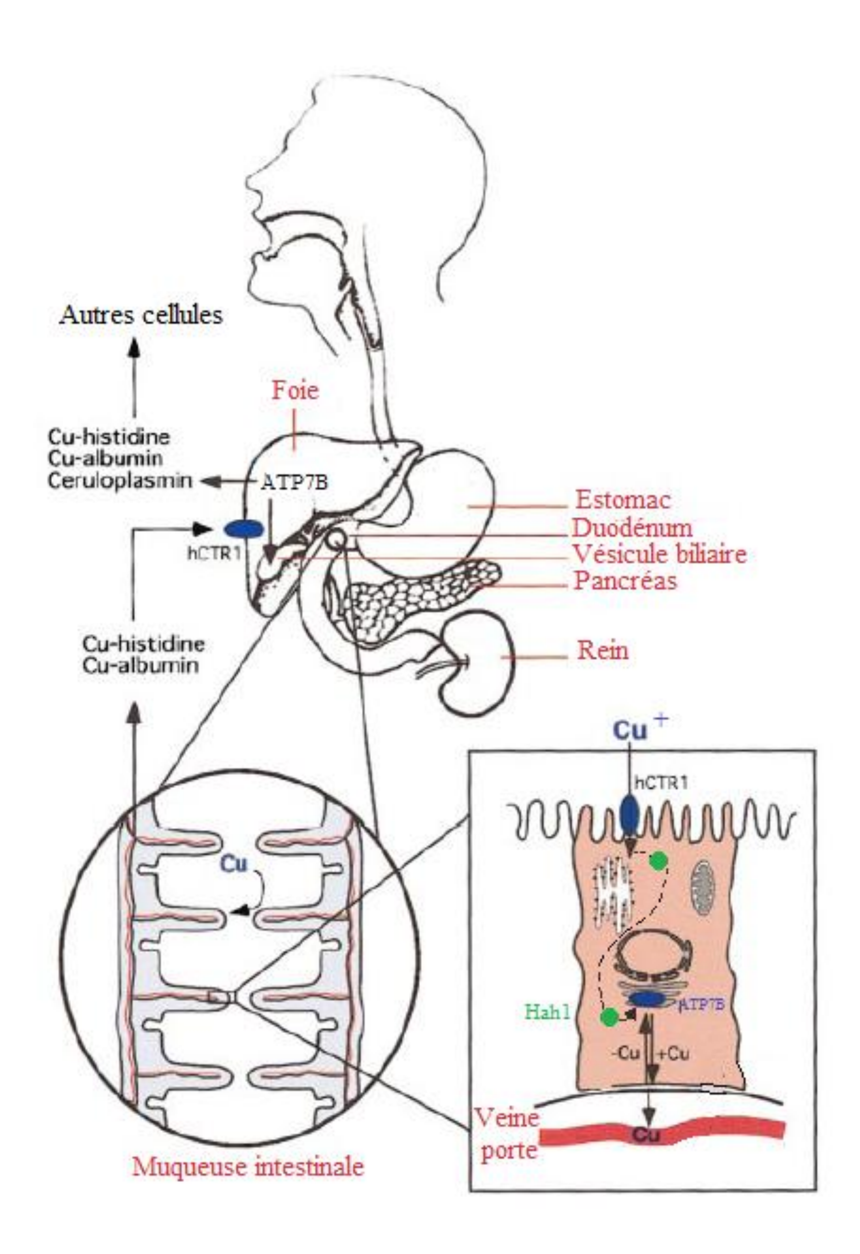


Figure 1 : Illustration de l'absorption du cuivre chez l'homme. Le cuivre est ingéré, puis est capté par la muqueuse intestinale où il pénètre sous la forme Cu^+ grâce au transporteur hCtr1. Arrivé dans l'entérocyte, il est pris en charge par Hah1, une molécule chaperonne qui le conduit jusqu'à l'ATP7A du trans-golgi. Il est alors excrété dans la veine porte où il se lie à l'histidine, l'albumine et la transcupréine. Le cuivre est acheminé jusqu'au foie dans lequel il rentre grâce à hCtr1. Au niveau du foie, il est soit excrété dans la bile, soit incorporé à la céruloplasmine et libéré dans le sang où il est alors apporté à d'autres cellules [4].

B. Le cuivre dans le foie

Le transporteur hCtr1, présent dans la membrane des hépatocytes, capte le cuivre et le fait rentrer dans la cellule [13]. Une fois à l'intérieur le cuivre se fixe à (Figure 2) :

- des molécules chaperonnes (Hah1, la « Copper Chaperone for SOD1 » (CCS) et Cox 17), chargées de son transport cytosolique pour le redistribuer ensuite vers les cuproprotéines effectrices [5,8]. Il n'a cependant pas été démontré qu'il existait une interaction directe entre hCtr1 et les molécules chaperonnes, il est donc possible qu'il existe un intermédiaire [14].

- des métallothionéines, c'est à dire des molécules de faible poids moléculaire chargées du stockage de cuivre [5,10] et ayant des propriétés anti-oxydantes [12].

- au glutathion, intervenant dans la détoxification du cuivre [10]. Lorsque le cuivre, sous forme Cu^{+} entre dans la cellule, le glutathion s'y fixe immédiatement pour éviter une surcharge cuprique, puis le redistribue aux métallothionéines [15,16].

Les ions de cuivre libres (Cu^{+} ou Cu^{2+}) sont toxiques pour la cellule, ils sont donc entièrement liés en conditions normales [5,16,17]

1. Synthèse de la céruloplasmine

Le cuivre, lié à la molécule chaperonne Hah1, est acheminé vers l'appareil de Golgi où il est pris en charge par l'ATP7B [8,18]. L'ATP7B est une ATPase de type P, similaire à l'ATP7A bien que cette dernière ait des capacités de transport plus importantes [9,19]. Elle est présente sur l'appareil trans-golgien des cellules du foie et des reins, et en très faibles quantités dans le placenta, le cerveau, le cœur et les poumons [1,20]. Elle assure le passage du cuivre dans l'appareil de Golgi pour permettre son incorporation à la céruloplasmine, ainsi qu'à d'autres cuproprotéines [5,20].

La céruloplasmine est une ferroxydase qui comporte 6 atomes de cuivre et est synthétisée dans le foie. Ces atomes de cuivre sont rapidement incorporés lors de la synthèse de cette protéine, par un processus de « tout ou rien » [21-22]. Le complexe ainsi formé est nommé l'holocéruloplasmine. Soixante-dix pourcent du cuivre circulant dans le plasma est présent sous cette forme-ci |12,23,24].

2. Distribution à la superoxyde dismutase

Le cuivre lié à la molécule chaperonne hCCS est transféré à la superoxyde dismutase (SOD) [8]. La superoxyde dismutase est une enzyme présente dans le cytosol et dans l'espace inter-membranaire des mitochondries de toutes les cellules, dont le foie. Elle utilise le potentiel réducteur du cuivre pour catalyser la réaction de transformation du superoxyde

(O_2^-) en peroxyde hydrogène (H_2O_2) et oxygène (O_2), et ainsi protéger les cellules contre les radicaux libres, qui sont toxiques [5,8,20].

3. Distribution à la mitochondrie

La molécule chaperonne Cox17 lie trois Cu^+ [8] et transite entre le cytosol (40% de la quantité totale de Cox17 présente dans la cellule se trouve dans le cytosol) et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (60% de la quantité totale de Cox17 présente dans la cellule se trouve dans le cytosol) [4], où elle délivre le cuivre au cytochrome C oxydase. Elle est présente dans toutes les cellules de l'organisme dont les hépatocytes.

Le cytochrome C oxydase est la dernière enzyme de la chaine respiratoire mitochondriale, présente sur la membrane interne de la mitochondrie, qui possède deux sites de liaison pour le cuivre. Elle réduit la molécule d'oxygène en eau grâce au potentiel oxydo-réducteur du cuivre, tout en pompant des protons de l'intérieur vers l'espace inter-membranaire de la mitochondrie [5]. Ce processus permet par le retour des protons au travers d'une ATP-synthase de créer de l'énergie cellulaire.

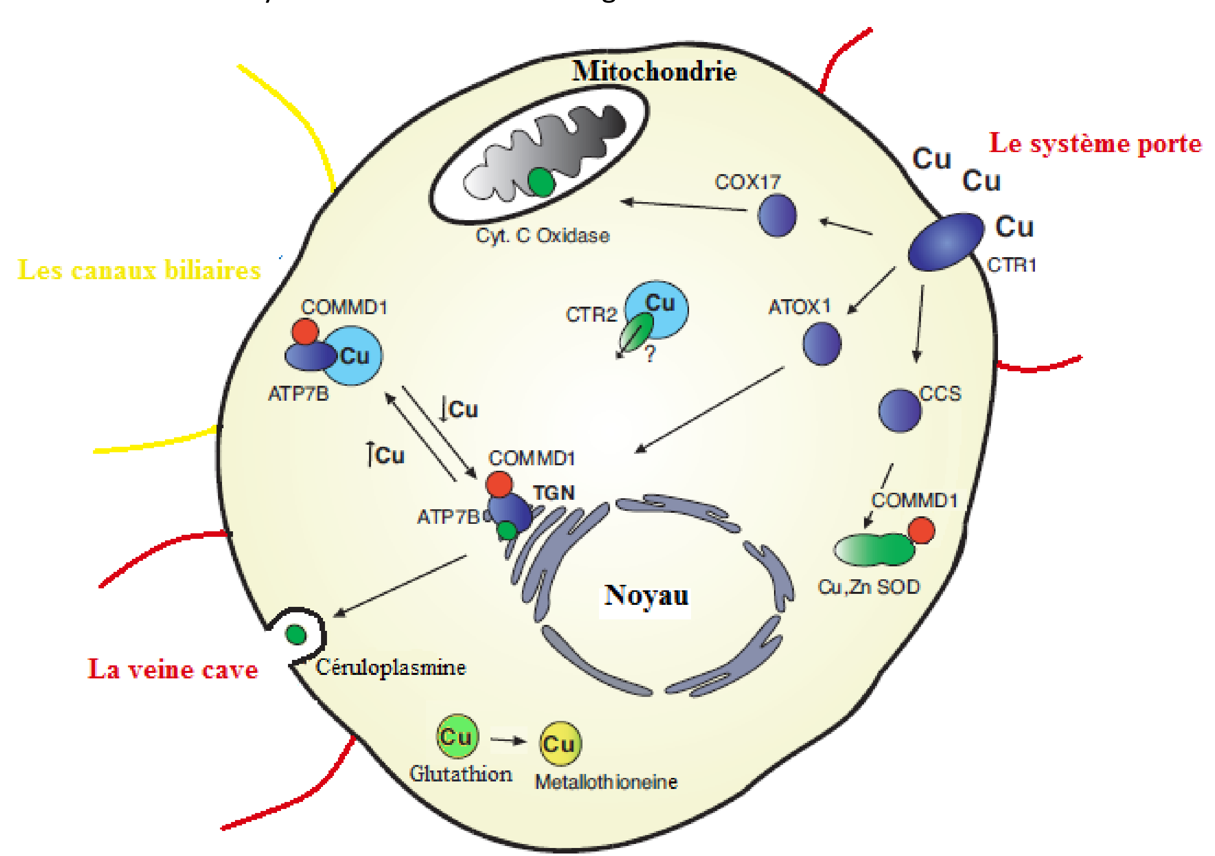


Figure 2 : Le cuivre dans les hépatocytes. Le cuivre rentre dans les hépatocytes grâce au transporteur hCTR1. Arrivé dans le secteur intracellulaire il est pris en charge par les molécules chaperonnes : COX17 délivre le cuivre au cytochrome C oxydase de la mitochondrie, CCS à la Cu/Zn SOD dont la maturation et l'activation sont catalysées par COMMD1, ATOX1 à l'ATP7B de l'appareil de Golgi pour son incorporation dans la céruloplasmine. Lorsque la teneur en cuivre intracellulaire est élevée, l'ATP7B est transloquée dans des vésicules vers la membrane des canaux biliaire pour excréter le cuivre dans la bile. Le cuivre se lie également au glutathion puis est transféré aux métallothioneines. Il existerait également un autre moyen de stockage du cuivre : des vésicules portant à leur surface le transporteur hCTR2, un transporteur similaire à hCTR1 qui permettrait la libération de ce cuivre en cas de nécessité (d'après [4,10,11,35,39]).

C. Transport sanguin

L'holocéruloplasmine formée dans le foie est excrétée dans la circulation sanguine et est distribuée aux autres cellules qui possèdent des récepteurs spécifiques [25]. L'holocéruloplasmine se lie aux récepteurs, ce qui induit un changement de sa conformation et permet la libération de 4 des 6 atomes de cuivre [26]. Sans cette liaison le cuivre reste emprisonné dans la céruloplasmine, sans échange possible [12,22,27,28].

Malgré cela, la céruloplasmine n'est pas essentielle dans le métabolisme du cuivre car son absence n'entraine pas de déficit en cuivre. En effet, d'autres protéines telles que l'albumine ou la transcupréine peuvent remplir la fonction de transporteur en cas de déficit en céruloplasmine [29-30].

Il existe une autre forme, appelée apocéruloplasmine contenant un unique atome de cuivre, que l'on retrouve en faible quantité dans le sang. Cette forme là n'est pas fonctionnelle car ne possède pas la même conformation que l'holocéruloplasmine [31], et possède une demi-vie plus courte [28]. Le cuivre a donc un rôle essentiel dans la fonction et la stabilité de la céruloplasmine.

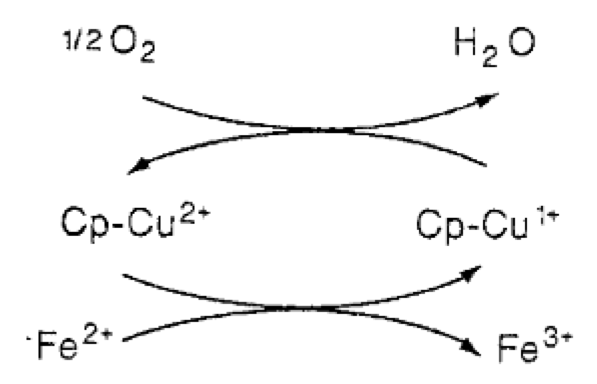


Figure 3 : Mécanisme d'action de la céruloplasmine. En plus de son rôle de transporteur la céruloplasmine est une ferroxydase, elle utilise le potentiel oxydo-réducteur du cuivre pour oxyder le fer. L'holocéruloplasmine retourne à son état d'origine en réduisant l'oxygène. Le métabolisme cuprique est donc étroitement lié au métabolisme du fer [29].

Outre la liaison à la céruloplasmine, voire à l'albumine et à la transcupréine, le cuivre peut aussi se lier à d'autres protéines [34] (Tableau 1).

Composant	Proportion de cuivre		
	µg/l	µM	%
Céruloplasmine	650–700	10–11	65–70
Albumine	120–180	2–3	12–18
Transcupréine (macroglobuline)	90	1.4	9
Ferroxydase II	10	0.16	1
Superoxyde dismutase extracellulaire et histidine	< 10	< 0.16	< 1
Facteurs de coagulation V et VIII	< 5?	< 0.08	< 0.5?
Metallothionéines exracellulaire	< 1?	< 0.02	< 0.1?
Composés de 15-60kDa	40	0.63	4
Petits peptides et acides aminés	35	0.55	4
Cuivre libre	0.0001	0.0000002	0

Tableau 1 : Composants liant le cuivre dans le plasma chez l'homme et leur proportion [5].

Enfin, on retrouve du cuivre dans les globules rouges où il est le cofacteur de la SOD [32-33].

D. L'utilisation du cuivre

Il existe de multiples enzymes qui utilisent le cuivre comme cofacteurs (un cofacteur est une substance chimique non protéique mais liée à une protéine, qui est nécessaire à l'activité biologique de celle-ci), hormis celles-citées précédemment (Tableau 2) comme, par exemple :

- La lysyl oxydase joue un rôle crucial dans la formation, la maturation et la stabilisation des connections inter-tissulaire, dont la liaison collagène – élastine [9,20]. Elle fait partie de la matrice extracellulaire et cette enzyme est inactive en l'absence de cuivre. Le cuivre ne catalyse pas la réaction mais intervient dans la structure de l'enzyme et l'a rend ainsi active [5].

- La tyrosinase est impliquée dans la synthèse de mélanine. Elle est inactive en l'absence de cuivre, aussi la carence en cuivre se traduit par une hypopigmentation de la peau, des cheveux et des poils [9].

- La peptidyl glycine monooxygénase est importante pour la synthèse d'hormones neuroendocrines [9].

- L'héphaestine est un homologue de la céruloplasmine et a aussi une activité ferroxydase. C'est une protéine transmembranaire qui est impliquée dans l'absorption intestinale du fer [5].

Cuproenzyme	Fonction
Céruloplasmine	Ferroxydase - Transport du fer - Transport du cuivre
Cu/Zn SOD	Détoxification des radicaux libres
Cytochrome c oxydase	Production d'énergie cellulaire par transport d'électron dans le mitochondrie
Métallothionéines	Stockage du cuivre en surplus et d'autres ions divalent métallique
Lysyl oxydase	Liaison collagène-élastine
Tyrosinase	Formation de la mélanine
Dopamine β- hydroxylase	Formation de catécholamine
Peptidylglycine α-amidating mono-oxygenase	Bioactivation de neuropeptides et d'hormone peptidiques
Héphaestine	Ferroxydase - Aide l'absorption du fer - homologue de la céruloplasmine
CMGP	Ferroxydase - Homologie de la céruloplasmine
Protéine des prions (PrPC)	Lie le cuivre - Propriété inconnue
S-Adenosylhomocysteine	Métabolisme d'hydrolyse des acides aminés sulfurisés
Protéine précurseur du β- amyloïde	Fonction inconnue
Angiogénine	Angiogenése
Facteur de coagulation V et VIII	Coagulation

Tableau 2 : Enzymes utilisant le cuivre comme cofacteur et leur fonction (d'après [4,5,11]

E. L'élimination du cuivre

Le cuivre est principalement excrété dans la bile (98%) [35]. Une faible quantité est excrétée dans la salive, l'urine ou encore via la desquamation des cellules épithéliales gastriques et intestinales [5] (Tableau 3).

Fluides	Concentration en cuivre	Excretion journalière
	µg/g	≈µg
Salive	0.22	330–450
Suc gastrique	0.39	1000
Bile	4.0	2500
Sécrétion pancréatique	0.3–0.9	400–1300
Urine	0.02–0.05	30–75

Tableau 3 : Les voies d'excrétion du cuivre chez l'homme. On a donc une excrétion moyenne d'environ 5325ug de cuivre par jour (d'après [12,26]).

La majorité des cellules ne peuvent pas éliminer le cuivre. Elles le relarguent alors dans le sang par deux voies : l'exocytose et par diffusion au travers de la membrane plasmique. Cette deuxième voie rentre en jeux principalement lorsque le cuivre est en grande quantité dans la cellule [5]. Le cuivre relargué retourne au foie pour être éliminé [36].

Le mécanisme précis d'exportation du cuivre dans la bile n'est pas entièrement résolu, mais on suppose que l'ATP7B et le « Copper Metabolism gene MURR1 containing Domain 1 » (COMMD1) coordonnent la fusion des vésicules contenant le cuivre avec la membrane des canalicules biliaires [1,5,10,11,35,37] (Figure 2).

Le cuivre se retrouve alors dans la bile où il est lié à l'acide taurochénodéoxycholatelécithine. Cette liaison empêche la réabsorption du cuivre qui vient d'être excrété. Le complexe se dissocie par la suite dans le gros intestin, où seul l'acide biliaire peut être réabsorbé, et le cuivre est éliminé dans les fèces [38].
Cependant, le cuivre excrété dans la salive, les sécrétions pancréatiques et le suc gastrique est libre et donc réabsorbé [12].

F. L'homéostasie

La concentration en cuivre est finement régulée. Les étapes clefs de la régulation sont :
- L'absorption intestinale,
- Le stockage,
- L'excrétion biliaire [2].

1. L'absorption intestinale

Lorsque la concentration en cuivre dans les hépatocytes augmente, l'absorption intestinale diminue. Cela est principalement du au transporteur hCtr1 [5].

hCtr1

Lorsque la concentration extracellulaire en cuivre augmente légèrement hCtr1 est endocyté, ce qui diminue le nombre de récepteurs présents sur la membrane plasmique des entérocytes et donc l'absorption du cuivre. Si cette concentration augmente encore, hCtr1 est rapidement dégradé, dans le but de prévenir son retour à la surface de la cellule [25,35,40,41].

ATP7A

Lorsque la concentration intracellulaire en cuivre augmente l'ATP7A est transloquée vers la membrane plasmique pour éliminer le surplus de cuivre [41,42]. Un mécanisme similaire à celui de l'ATP7B contrôle cette relocalisation (voir ci-dessous) [1,34].

Dans les cellules polarisées, l'ATP7A se dirige vers le pôle basolatéral et s'y accumule sous forme de vésicules libérées par exocytose [19]. Il existe un turn-over permanent de l'ATP7A entre la membrane plasmique et les vésicules [1,19] (figure 4).

Quand la concentration intracellulaire en cuivre est redevenue normale l'ATP7A retourne dans l'appareil de Golgi [4] (figure 4).

2. Le stockage

Lors d'un excès de cuivre dans le cytoplasme des cellules, celui-ci se lie directement au glutathion, sous forme de Cu^+ [43]. Le cuivre étant toxique à l'état libre, ce phénomène permet de protéger la cellule. Il est par la suite transféré aux métallothionéines qui assurent son stockage [5,9,15].

Les métallothionéines sont codées par au moins 10 gènes et les quatre principales protéines qui en découlent sont nommées de MT-1 à MT-4 [42,43]. L'expression de ces gènes est stimulée en cas de forte concentration cytoplasmique cuprique par l'intermédiaire de MTF-1 [44].

La « Metal-responsive element binding transcription factor-1 » (MTF-1) est une protéine présente en temps normal dans le cytoplasme et qui s'accumule dans le noyau de la cellule lorsque la concentration en cuivre augmente, pour activer la transcription des métallothionéines [35,42].

Il semblerait qu'il existe également un autre moyen de stockage du cuivre dans les cellules : un stockage intra vacuolaire. hCtr2p est un transporteur de faible affinité pour le cuivre, similaire à hCtr1 [41], et présent à la surface de ces vacuoles pour mobiliser cette réserve en cas de déficit en cuivre [11,14].

3. L'excrétion biliaire

L'excrétion biliaire est le mécanisme principal de l'homéostasie du cuivre [5].

Lorsque la concentration en cuivre augmente dans le cytoplasme des hépatocytes l'ATP7B lie le cuivre, ce qui entraine une modification de la conformation du transporteur. L'ATP7B laisse alors apparaitre un site de phosphorylation spécifique d'une caséine kinase II. Ainsi, lors de concentration cuprique en augmentation, le taux de phosphorylation de l'ATP7B augmente également [1]. Ce processus est rapide, spécifique et réversible [45]. Lorsque les deux sites de phosphorylation sont occupés, l'ATP7B est transférée de l'appareil de Golgi à des vésicules péri caniculaires, en vue d'être excrété dans la bile [5,11,20,35,37,39,41,42,46].

Dans des cellules polarisées, l'ATP7B se dirige vers le pôle apical. La majorité de l'ATP7B se retrouve alors à la surface des vésicules [19] (Figure 4).

En cas de chute rapide de la concentration intracellulaire en cuivre, le taux de phosphorylation de l'ATP7B diminue, ce qui entraine sont retour rapide au trans-golgi [20].

Cette migration de l'ATP7B en fonction de la concentration en cuivre a uniquement été mise en évidence dans les hépatocytes. Il est possible que ce phénomène ne soit pas présent dans les autres cellules exprimant ce transporteur [1,19].

Comme vu précédemment, COMMD1 intervient dans l'excrétion des vésicules formées. COMMD1 est inhibé par la « X-linked inhibitor of Apoptosis Protein » (XIAP), qui active sa dégradation.

Lorsque le cuivre est présent en forte quantité dans la cellule, XIAP reçoit du cuivre de la part de CCS ce qui aboutit à un changement de conformation de cette protéine qui est alors dégradée. L'inhibition exercée sur COMMD1 est alors levée et l'excrétion biliaire favorisée [10].

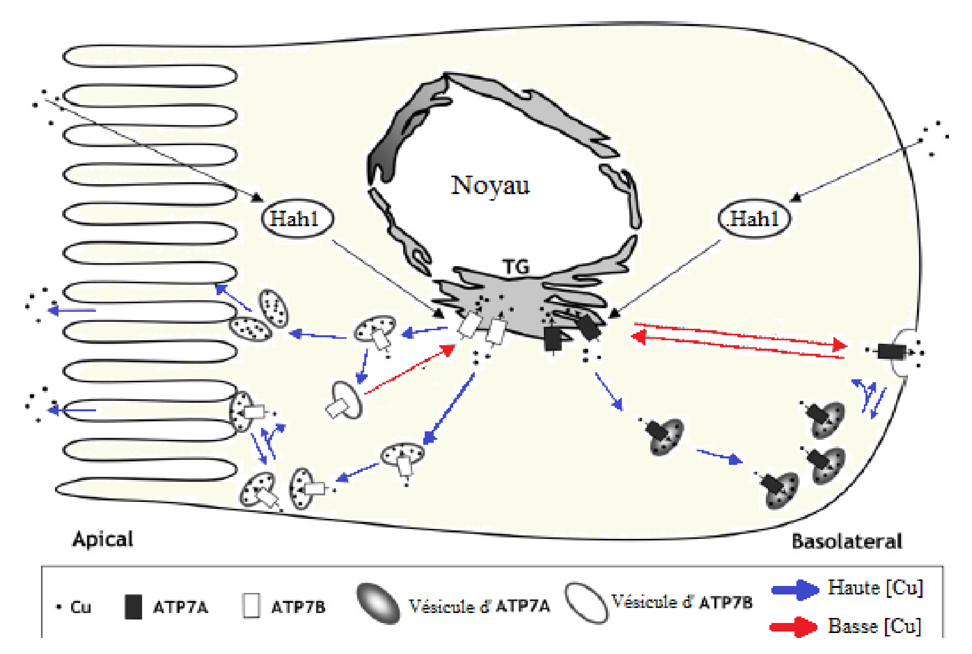


Figure 4 : Localisation de l'ATP7A et de l'ATP7B dans les cellules en fonction de la concentration en cuivre. Lorsque la concentration en cuivre est élevée (flèches rouges), l'ATP7A se redirige vers le pôle basolatéral de la cellule et se recycle en permanence entre la membrane plasmatique et un pool de vésicules intracellulaires qui capture le cuivre. L'ATP7B se redirige vers le pôle apical de la cellule où il s'accumule à la surface de vésicules rassemblées près de la membrane cellulaire. Il existe également un faible pool de vésicules qui se recyclent en permanence tout comme pour l'ATP7A. Lorsque la concentration en cuivre retrouve son niveau basal l'ATP7A retourne au niveau du Trans-Golgi (TG) par transcytose. L'ATP7B retourne également au niveau du TG alors que les vésicules accumulées transitent vers la membrane des canicules biliaires pour être excrétées. Sur ce schéma l'ATP7A et l'ATP7B sont représentés dans une même cellule mais cela ne représente pas la situation réelle : ces transporteurs sont en réalité exprimés dans des cellules différentes à l'exception du placenta et du tissu mammaire [1].

G. Le cuivre pendant la gestation et la lactation

1. La gestation

Le cuivre est transféré au fœtus via le placenta et, secondairement, via l'ingestion de liquide amniotique [5]. Les formes libres ou liées à des acides aminés sont probablement celles qui sont les mieux transmises [47], la céruloplasmine n'ayant pas un rôle essentiel dans ce processus [29].

L'ATP7A et l'ATP7B jouent un rôle primordial dans le transport du cuivre dans le placenta. Les deux transporteurs sont présents dans les syncytiotrophoblastes du placenta et ont des rôles différents :

- l'ATP7A, étant localisé au pôle basolatéral de la cellule, intervient dans le passage du cuivre dans la circulation sanguine fœtale.
- L'ATP7B, étant localisé au pôle apical de la cellule, intervient dans l'exportation du cuivre du placenta vers la mère pour protéger le fœtus d'une éventuelle surcharge cuprique [1].

Arrivé dans le fœtus, le cuivre se lie aux métallothionéines et est stocké dans le foie. Cela permet au fœtus d'accumuler des réserves pour ses premiers mois de vie [5].

Le cuivre est majoritairement délivré au fœtus pendant le dernier tiers de gestation [5]. On a, à ce moment là, une diminution de la concentration en ATP7B ainsi qu'une relocalisation de ce transporteur vers l'appareil de Golgi, ce qui permet un apport bien plus important de cuivre vers la circulation sanguine fœtale (Figure 5).

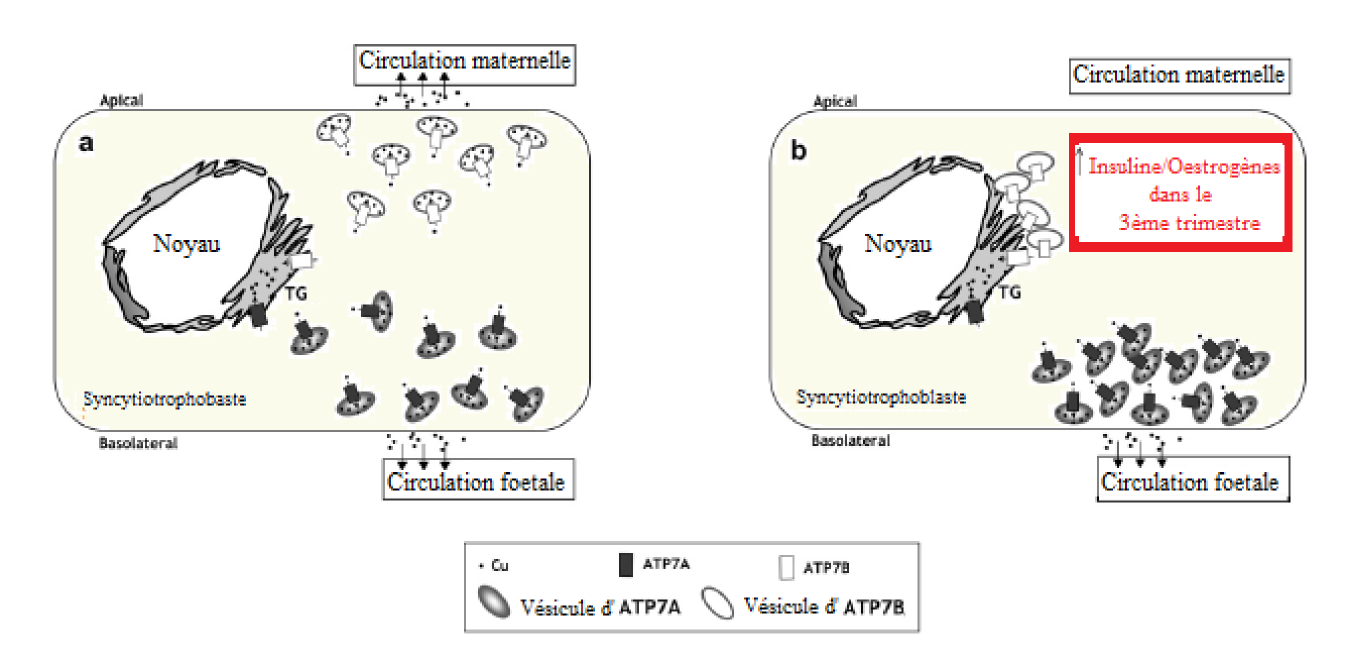


Figure 5 : Métabolisme du cuivre dans le placenta. Au début de la gestation l'ATP7A est situé au pôle basolatéral des syncytiotrophoblastes du placenta, assurant le passage du cuivre de la mère au fœtus. L'ATP7B est situé au pôle apical renvoyant le cuivre vers la circulation sanguine de la mère, ce qui protège le fœtus d'une surcharge cuprique. Dans le troisième tiers de gestation le taux d'insuline et d'œstrogène augmente, ce qui induit la redirection de l'ATP7B vers le trans-Golgi (TG) alors que l'ATP7A s'accumule en plus grand nombre au pôle basolatéral de la cellule. Ainsi, le transport du cuivre de la mère au fœtus est beaucoup plus important (d'après [1]).

2. La lactation

Après la naissance, le cuivre est délivré au nouveau né via le lait [5].

Dans les premiers jours de vie, il est principalement lié à la céruloplasmine (70% dans les 5 premiers jours). La céruloplasmine, une fois absorbée, se retrouve intacte dans la circulation sanguine du nouveau né [48]. Elle est synthétisée par le tissu mammaire pendant la lactation par un processus semblable à celui du foie [48].

Par la suite, le cuivre est principalement lié à l'albumine dans le lait, seul 20-25% reste lié à la céruloplasmine au bout d'un mois de lactation, chez l'homme [1,49-50].

II. Le dosage du cuivre

A. Le prélèvement

1. Le sang

De nombreuses enzymes ont été testées comme marqueur indirect du statut en cuivre de l'organisme. En réalité, la concentration en cuivre dans le sang est un marqueur précoce d'un déficit en cuivre, chez l'homme [11].

Le dosage du cuivre peut se faire sur du plasma ou sur du sérum. Il est cependant conseillé de le faire sur du plasma, car il a été montré que l'on a une perte de céruloplasmine et donc de cuivre lors de la coagulation du sang. Le cuivre manquant se retrouve dans le culot. Le mécanisme est cependant inconnu [51].

2. Les tissus

Les biopsies hépatiques sont un prélèvement de choix pour le diagnostic d'un trouble cuprique. Cependant, ce n'est pas facile à obtenir et bien plus invasif qu'une prise de sang [52]. De plus, la teneur en cuivre est hétérogène entre les lobes mais également au niveau des *acini*. Ainsi, il est parfois difficile de conclure à partir d'une seule biopsie [10,34,53].

3. Les cheveux

Le dosage de cuivre dans les cheveux est théoriquement idéal, car il reflète les variations chroniques du statut en cuivre de l'organisme. Le prélèvement est simple et rapide à réaliser et la concentration est plus élevée que dans le sang, ce qui rend les dosages plus faciles [54]. Cependant, le taux de cuivre dans les cheveux est très variable en fonction :

- des contaminants extérieurs tels que le sébum, la transpiration ou les résidus de cuivre présents dans l'air et dans les cosmétiques [52,55],
- de facteurs individuels tels que la race, la couleur des cheveux ou le sexe [56],
- de l'alimentation [54],
- des traitements médicamenteux reçus par le donneur [52,54],
- de facteurs pré-analytiques tels que le temps entre le prélèvement et l'analyse [54].

De plus, le mécanisme d'incorporation des oligo-éléments dans les cheveux n'est pas connu et aucun lien n'a été mis en évidence entre la concentration de cuivre dans le sang et dans les cheveux [54,56]. Ce prélèvement ne doit donc pas être utilisé.

4. L'urine

L'excrétion urinaire du cuivre varie dans la journée. Il est donc nécessaire de récolter les urines sur 24 h pour pouvoir interpréter les résultats [58].

De plus, comme vu précédemment, ce n'est pas la voie principale d'élimination du cuivre. On a donc des concentrations beaucoup plus faibles que dans le sang, ce qui rend les dosages moins fiables [59].

Pour finir, le cuivre plasmatique est intimement lié à la céruloplasmine qui n'est pas éliminée dans les urines. En dosant le cuivre dans les urines, on a donc uniquement accès à la fraction libre, seule partie du cuivre excrété dans les urines. Or, c'est la fraction liée à la céruloplasmine qui varie principalement. On peut donc difficilement interpréter les résultats [12,60].

B. Le dosage

1. Méthode de dosage

Il existe de nombreuses techniques de dosage des oligoéléments telles que la voltimètrie et la chromatographie d'ions, mais la spectrométrie est la méthode la plus sensible et la plus rapide [61-62].

Il existe 3 principes de dosages de spectrométrie :

- la spectrométrie de masse,
- la spectrométrie d'émission atomique,
- la spectrométrie d'absorption atomique.

Quelque soit le principe utilisé, le dosage par spectrométrie permet de doser plusieurs métaux, en même temps, dans un échantillon. C'est une technique précise, fiable et rapide qui nécessite en général une préparation préalable des échantillons [52,63]. Il existe de nombreuses méthodes de préparation des échantillons qui ont toutes pour but d'éviter les interférences (voir ci-dessous). Par exemple, on réalise souvent une dilution à l'acide nitrique pour éliminer la matière organique contenue dans le prélèvement et qui peut interférer lors de l'atomisation ou encore colmater les bruleurs [61,64-65].

2. Les interférences en spectrométrie

En spectrométrie, il existe des interférences spectrales et non spectrales.
Les interférences non spectrales sont d'origine physique alors que les interférences spectrales sont d'origine chimique.

Les interférences non spectrales, également appelées effet matrice, sont dues à la présence de composants matriciels dans l'échantillon. Cet effet matrice est facilement contrebalancé par :

- un calibrage externe : on donne à la machine des produits de référence contenant l'oligoélément que l'on dose en concentration connue,
- un calibrage interne : on étalonne la machine à l'aide de solutions composées de l'échantillon auquel on ajoute une quantité connue de l'élément d'intérêt [52,61].

Les interférences spectrales sont dues à des éléments présents dans l'échantillon à doser et ayant des propriétés chimiques similaires à celles de l'élément d'intérêt (masse moléculaire, rayon d'absorption etc...). Elles sont plus difficiles à contrôler [66].

III. Les facteurs de variations connus de la concentration en cuivre dans le sang chez l'homme

De nombreux facteurs peuvent faire varier la concentration en cuivre dans le sang. Pour interpréter les résultats d'un dosage en cuivre il est donc important de les connaitre.

A. Variations pré-analytiques

1. Sérum et plasma

Comme vu précédemment, le dosage du cuivre peut s'effectuer sur du sérum ou sur du plasma. La concentration en cuivre dans le plasma est toujours supérieure à celle du sérum [67]. En effet, il a été montré que lors de la coagulation du sang une partie du cuivre lié à la céruloplasmine est séquestrée dans le culot. Le mécanisme est cependant inconnu [51,68]. De plus, le taux de cuivre séquestré est indépendant de la concentration initiale présente dans le plasma. Il est donc conseillé de réaliser les dosages à partir de plasma.

2. Le stockage

La concentration en cuivre d'un prélèvement sur sang total varie en fonction du temps de stockage et de la température, et ce indépendamment du contenant. Des variations majeures sont observées au bout d'une semaine. Pour limiter les variations, il est conseillé de centrifuger les échantillons immédiatement après prélèvement et de ne conserver que le plasma. De plus, pour un stockage de plusieurs semaines, les échantillons peuvent être congelés à -20°C [66].

B. Variations physiologiques

1. Alimentation

L'alimentation est un facteur principal de variation du cuivre. Ce facteur reste cependant difficile à interpréter bien qu'il soit très étudié [62].

Le moment du repas

Après un repas, il y a deux pics de concentration en cuivre. Le premier a lieu 1 à 2h après l'ingestion et correspond au cuivre récemment absorbé, lié à l'albumine. Ce pic retombe rapidement et est suivi par un deuxième au bout de 2 à 4h, qui correspond à du cuivre incorporé à la céruloplasmine dans le foie et qui se retrouve à nouveau dans le sang. Il s'en suit un plateau qui dure 36 à 48h [66,69].

Ces variations sont cependant faibles (moins de 8%) et peuvent être négligées [70-71].

La composition du repas

- *Energie*

La concentration en cuivre dans le sang augmente lorsque, pour une même quantité de cuivre, le nombre de calories ingéré augmente [72].

- *Protéines*

Les protéines facilitent l'absorption du cuivre [2,73] et cet effet est d'autant plus marqué que les protéines sont d'origine animale. Le besoin de cuivre diminue en fonction de la quantité de protéines ingérées [50].

- *Glucides*

Le fructose diminue l'absorption du cuivre. L'amidon n'a aucun effet [2,74].

- *Matières grasses*

La concentration plasmatique en cuivre augmente avec la consommation d'acide gras [72]. Cette augmentation est plus importante avec les acides gras saturés [74].

- *Fibres*

Une alimentation riche en fibres augmente l'élimination fécale en cuivre et donc diminue son absorption. Cependant, cela ne semble pas avoir d'effet sur la concentration dans le sang, du moins à relativement court terme (moins de trois semaines) [50,73,75].

- *Oligo-éléments*

  - *Cuivre*

Le taux de cuivre dans la ration influence son absorption par les entérocytes :

- Lorsqu'il est faible, l'absorption du cuivre augmente. S'il est trop faible, l'organisme n'arrive plus à compenser et on a alors une diminution de la concentration en cuivre dans le sang [76]. Par exemple, lorsque l'ingestion de cuivre est de 1 mg/kg (en accord avec les recommandations d'apport journalier de l'homme), plus de 50% est absorbé [16].

- L'absorption diminue avec l'apport alimentaire en cuivre [76]. Par exemple lorsque l'ingestion de cuivre est de 5 mg/kg, moins de 20% est absorbé [16].

- *Zinc*

Un apport excessif en zinc peut être à l'origine d'un déficit en cuivre. Le zinc induit la synthèse de métallothionéines dans la muqueuse intestinale. Ces deux métaux sont alors en compétition pour ces protéines nouvellement synthétisées, mais le cuivre possède une affinité plus importante et s'y lie plus avidement. Ce cuivre est alors séquestré dans les cellules intestinales et ne rejoint pas le sang. Il est, par la suite, éliminé par desquamation des cellules de la muqueuse digestive [73,77-79].

- *Fer*

Un antagonisme entre le fer et le cuivre a également été mis en évidence lors de l'absorption intestinale de ces deux éléments [77,80]. On suppose que cela est le reflet d'une compétition pour DMT1 [6]. Cet effet est cependant moins marqué que celui observé avec le zinc [81].

- *Etain*

Une augmentation de la proportion d'étain dans la ration (cinq fois la quantité de cuivre) diminue l'absorption du cuivre. Cet effet ne s'observe qu'après 4 semaines de consommation [82].

- *Cobalt*

Le cobalt peut se retrouver en grandes quantités dans l'alimentation lors d'une contamination accidentelle. Libre, il n'a pas d'effet sur l'absorption du cuivre. Cependant lorsqu'il est en présence d'histidine, l'absorption du cuivre est diminuée d'un tiers [82].

- *Cadmium*

Le cadmium peut également diminuer l'absorption du cuivre par un mécanisme similaire à celui du zinc : il induit la synthèse de métallothionéines dans la muqueuse intestinale [73].

➢ *<u>Les vitamines:</u>*

- *L'acide ascorbique (vitamine C)*

La vitamine C diminue l'absorption du cuivre lorsqu'elle est prise par voie orale. Par exemple, chez l'homme, une prise de 2.5 mg d'acide ascorbique diminue l'absorption du cuivre d'environ 15% [2,50,83].

- *Autres*

D'autres acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide lactique ou encore l'acide acétique augmentent la biodisponibilité du cuivre. C'est pour cela qu'en général, les fruits augmentent la concentration en cuivre [2].

L'eau

L'eau est une source de cuivre qui ne doit pas être négligée. La concentration en cuivre de l'eau varie en fonction de :

- la zone géographique [50,72],
- l'état et la composition des tuyaux. En effet, les tuyaux en cuivre sont communs dans de nombreuses zones. Lorsqu'ils sont abimés ils peuvent être une source majeure de cuivre. La concentration en cuivre dans l'eau peut, par exemple, être supérieure à 5 mg/L [35,50].

2. Les hormones

Le sexe

La concentration en cuivre dans le plasma est beaucoup plus élevée chez les femmes (10.7 à 26.6 µmol/L) que chez les hommes (8.8 à 17.5 µmol/L) [63,84,85,72]. Cette différence est liée à l'œstradiol qui stimule la production de céruloplasmine et génère une plus grande concentration en cuivre dans le plasma [24,86].

Chez les enfants non pubères, il n'y a donc pas de différence entre les filles et les garçons [87-88]. De même, chez les personnes de plus de 60 ans, (les femmes sont ménopausées), il n'y a pas de différence du taux de cuivre dans le plasma entre les sexes [32,89].

Il semblerait également qu'il y ait chez les femmes des variations cycliques du taux de cuivre, de plus ou moins 15% [60], en relation avec le cycle hormonal. En effet, la concentration de cuivre est plus élevée durant les menstruations, et plus faible pendant l'ovulation. Le mécanisme n'est pas bien connu et pas expliqué [24,71,86].

La gestation et la lactation

Lors de la grossesse, la concentration en cuivre dans le sang de la mére augmente, particulièrement durant le deuxième et le troisième trimestre. Elle atteint son maximum autour de la 22ème et 25ème semaine puis diminue progressivement jusqu'à l'accouchement [90]. Cette augmentation est d'autant plus marquée que la femme est primipare, et peut aller jusqu'à doubler [57]. On ne sait rien sur ce domaine chez les chiens.

La concentration en céruloplasmine augmente en parallèle. Comme vu précédemment, les œstrogènes stimulent la synthèse de céruloplasmine. On suppose donc que l'augmentation de céruloplasmine pendant la grossesse est due au taux d'hormones élevé. Cela n'a cependant pas été prouvé [47,84]. Cette augmentation pourrait également être due à une mobilisation du cuivre par le tissu mammaire avant la lactation, ou encore à

un mécanisme de défense de l'organisme maternel envers les produits issus du métabolisme du fœtus. En effet, la céruloplasmine a des propriétés anti-oxydantes [57].

Lors de la lactation, la concentration en cuivre dans le plasma reste constante et la concentration dans le lait diminue au fur et à mesure du temps, en parallèle de celle de la céruloplasmine (elle est divisée par trois au bout de 5 jours de lactation puis se stabilise) [48,91].

Les contraceptifs

La concentration en cuivre dans le sérum et la concentration en céruloplasmine dans le plasma augmentent lors de prise de contraceptifs oraux, chez la femme (concentration en cuivre de 10.7-26.6 µmol/L chez la femme sans contraceptif est de 15.7-31.5 µmol/L chez la femme prenant des contraceptifs) [60,84]. Cependant, les pilules actuelles étant de moins en moins « dosées » (riches en hormones), la différence s'atténue au cours du temps. Ce sont les œstrogènes contenus dans ces pilules qui sont responsables de cette augmentation [24,86]. En effet, les progestatifs n'ont aucun effet sur la concentration en cuivre dans le sang [90].

3. L'âge

Chez les enfants, la concentration en cuivre dans le sérum diminue avec l'âge [92,93].

Chez l'homme adulte, la concentration en cuivre augmente significativement avec l'âge, alors qu'elle a tendance à diminuer chez la femme [87] (Figure 6).

Chez l'homme, cette augmentation a été attribuée à la diminution de l'excrétion biliaire plutôt qu'à une augmentation des capacités d'absorption intestinale [2,84].

Chez la femme, cette diminution est probablement due à la diminution du taux et de l'activité des œstrogènes, avec l'âge [24,32,87].

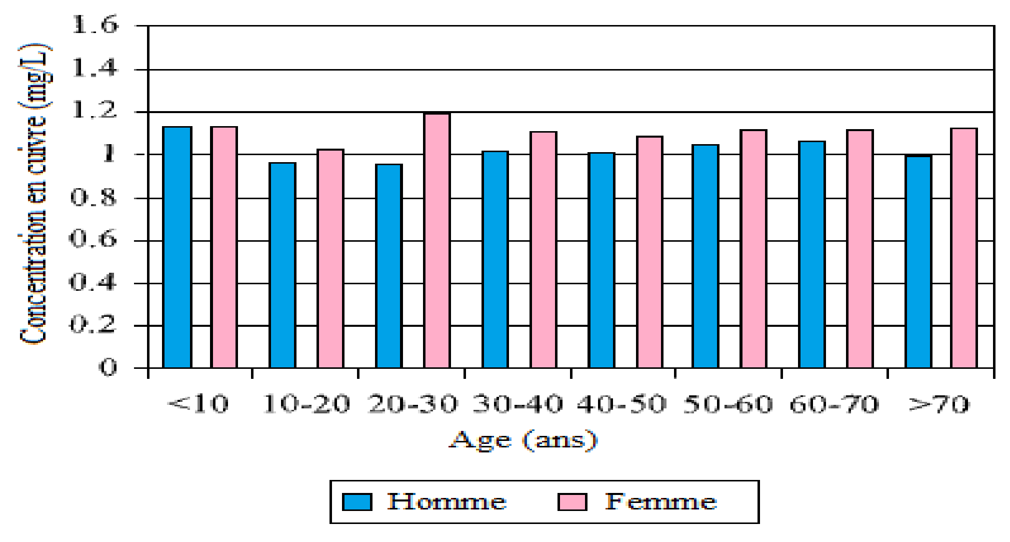


Figure 6: Variations de la concentration en cuivre en fonction de l'âge. Chez les hommes, elle diminue significativement alors que chez les femmes elle a tendance à augmenter (d'après [88]).

4. Variations journalières

Il y a une variation nycthémérale de la concentration en cuivre, ainsi qu'une variation du taux de céruloplasmine en parallèle, même si cette dernière est moins marquée, avec une diminution au cours de la nuit [94,95]. Ces variations sont cependant relativement faibles [71,96] (Figure 7).

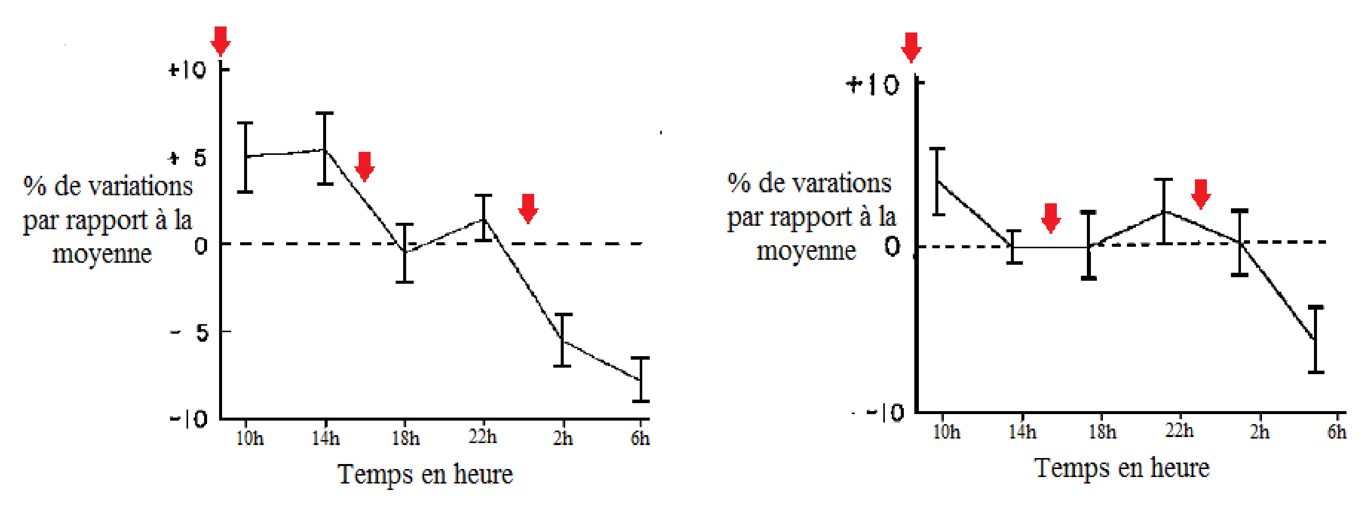


Figure 7 : Variations de la concentration en cuivre (à gauche) et en céruloplasmine (à droite) sur 24h, chez l'homme. Les données ont été récoltées sur une semaine. La concentration moyenne par heure sur la semaine pour chaque patient a été calculée, ainsi que la concentration moyenne de tous les patients, toutes heures confondues (ligne en pointillé). Les flèches correspondent aux repas (d'après [94]).

5. L'obésité

Les concentrations en cuivre et en céruloplasmine dans le sang sont plus élevées chez les personnes obèses [85,92,97,98]. La concentration en cuivre est proportionnelle à l'IMC (Indice de Masse Corporelle), chez les hommes, et non chez les femmes [87].

6. L'exercice physique

Lors d'un effort intense ponctuel, on note une augmentation d'environ 25% de la concentration en cuivre dans le plasma [88,99].

Au contraire, chez les personnes pratiquant une activité physique régulière, le cuivre est redistribué du sang vers les tissus et on observe une diminution de la concentration plasmatique en cuivre. Cette diminution pourrait également être due à une plus grande perte de cuivre lors des efforts répétés, notamment au niveau de la transpiration [85,88].

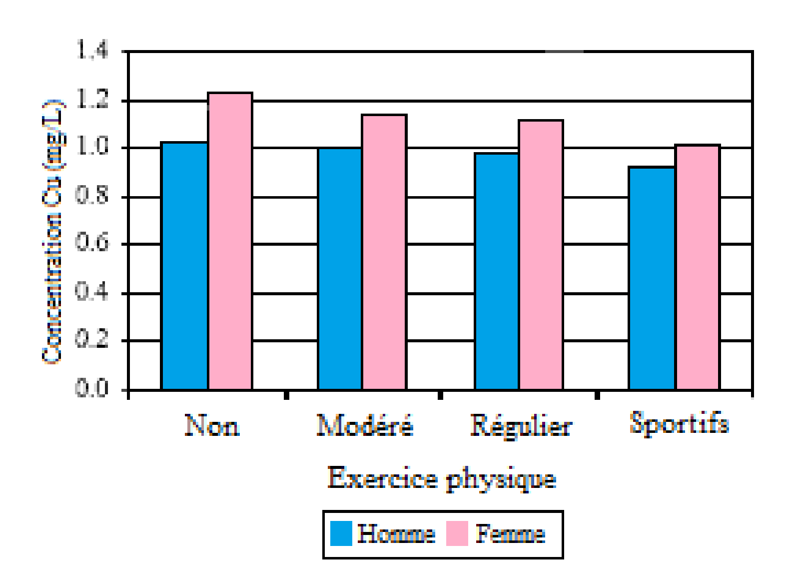


Figure 8 : Concentration en cuivre plasmatique en fonction de l'activité physique régulière pratiquée. On observe une diminution de la concentration cuprique avec l'activité physique chronique chez l'homme comme chez la femme, bien que cette différence soit plus marquée chez la femme (d'après [88])

C. Variations pathologiques

Chez l'homme, lorsqu'il y a des maladies intercurrentes le taux de cuivre est alors modifié. Pour interpréter un dosage en cuivre d'un patient malade, il est donc important de connaître ses variations.

1. Génétique

La maladie de Mankès

La maladie de Mankès se caractérise par un déficit en cuivre, et est fatale car il n'existe pas de traitement efficace. Elle est due à une mutation récessive du gène codant pour l'ATP7A, portée par le chromosome X, entrainant une perte de ce transporteur. On a alors une séquestration du cuivre dans les entérocytes et un déficit de cuivre dans le sang [39].

La maladie est principalement caractérisée par de la mortalité infantile, bien que la clinique soit variable [20].

La maladie de Wilson

La maladie de Wilson se caractérise par une surcharge en cuivre dans le foie ainsi qu'une libération de cuivre sous forme libre dans le sang. Cette fraction libre, potentiellement toxique, serait responsable de signes cliniques tels que des troubles neurologiques.

C'est une maladie autosomale récessive qui touche l'ATP7B, qui intervient dans le foie. L'ATP7B n'étant pas exprimée, on a donc une perte de la capacité à excréter le cuivre vers la bile et à incorporer le cuivre à la céruloplasmine [5,20,39].

Les signes sont principalement hépatiques (troubles de la coagulation, mort fulgurante, etc..) ou nerveux (ataxie, tremblements, rigidité, etc…).
Cette maladie est traitée par des chélateurs du cuivre.

Autres

D'autres maladies comme la cirrhose infantile indienne, « l'endemic tyrolean infantile cirrhosis » (ETIC) ou la toxicité cuprique idiopathique (maladie autosomiale récessive) ont été décrites chez l'homme. Ces pathologies apparaissent souvent tôt dans l'enfance et leur origine génétique n'a pas encore été identifié, mais est fortement suspecté [10-11].

2. Acquise

De déficit

- *Médicamenteux*

Un traitement par des sels de zinc perturbe l'absorption du cuivre, comme nous l'avons vu précédemment [39].

Il existe des chélateurs du cuivre tels que la pénicillamine ou le tétrathiomolybdate, prescrit lors de rhumatisme inflammatoire chronique, qui limitent la biodisponibilité du cuivre et peuvent, à terme, entrainer un déficit [5].

Un traitement à base d'anti-acides pendant une période prolongée diminue la concentration plasmatique en cuivre. Il semblerait que les anti-acides contiennent des oxydes qui précipitent les sels de cuivre à un pH alcalin et donc diminue l'absorption du cuivre [77].

- *Malassimilation*

Lors de malassimilation, l'absorption du cuivre est diminuée. On a alors un déficit en cuivre lorsque les réserves sont épuisées. Une malassimilation peut être secondaire à une intervention chirurgicale ou à une maladie digestive chronique [39,69].

- *Prématuré*

Lors de la gestation l'accumulation du cuivre chez le foetus se fait majoritairement durant le dernier tiers, la réserve en cuivre présente dans le foie est donc plus faible chez les prématurés. Comme les besoins en cuivre augmentent lors de la croissance, plus longue chez ses enfants là, on a fréquemment des déficits [77].

- *Pertes excessives*

Les personnes atteintes d'un syndrome néphrotique sont prédisposées à un déficit en cuivre, secondaire à une augmentation des pertes urinaires [77].

Lors de brûlure, on peut également avoir une perte importante de cuivre [77].

De surcharge

- *Médicamenteux*

Un traitement à base de glucocorticoïdes stimule la synthèse de métallothionéines et donc diminue la concentration en cuivre dans le sang [12,77,84,100,101].

- *Intoxication*

Une intoxication aigüe peut survenir lors d'un empoisonnement accidentel. La dose toxique rapportée chez l'homme est de 15 mg de cuivre par kilogramme, en une fois, soit environ dix fois l'apport journalier recommandé chez un adulte [39].

La faible incidence des toxicoses chroniques est probablement le reflet de l'efficacité des systèmes d'homéostasie du cuivre [39].

- *Inflammation-infection*

La concentration en céruloplasmine et en cuivre dans le plasma augmente lors d'inflammation ou d'infection, contrairement aux autres ions. En effet, la synthèse et l'excrétion de la céruloplasmine dans les hépatocytes sont stimulées par l'interleukine 1 et 6 [5,12,80].

- *Néoplasie*

Le cuivre pourrait être nécessaire à l'angiogénèse. C'est pour cela que beaucoup de tumeurs le séquestrent. Lors de processus néoplasique, on a une concentration en cuivre augmentée dans le sang [5,12,23,77,102].

- *Diabète*

Le taux de cuivre dans le plasma est plus élevé chez les personnes atteintes de diabète de type 1 ou 2. L'insuline entraine la relocalisation de l'ATP7A vers la membrane basolatérale des entérocytes, et joue ainsi un rôle dans l'export du cuivre surnuméraire présent en intracellulaire (acteur principal de l'homéostasie du cuivre). En cas de diabète, ce mécanisme n'est plus fonctionnel, on a donc une accumulation de cuivre dans le sang et dans les tissus [19,77,103].

➢ ***Obstruction biliaire***

On peut rencontrer des augmentations de la concentration en cuivre dans le sang lors d'obstruction du flux biliaire qui est la voie principale d'excrétion du cuivre [77].

3. Signes cliniques associés à une carence ou à un excès en cuivre:

Lors de déficit ou d'excès en cuivre, les signes cliniques sont en général peu spécifiques, ce qui rend le diagnostic difficile.

Signes cliniques d'un déficit en cuivre

Un déficit en cuivre se manifeste essentiellement par:

- des troubles de la démarche,
- un retard de croissance,
- des poils et cheveux secs et cassants,
- une décoloration de la peau et des cheveux [39,77,101,104].

On a également des signes biologiques tels que :

- une anémie car le cuivre, via l'héphaestine associé à un transporteur, intervient dans l'absorption du fer,
- une leucopénie, neutropénie,
- une thrombopénie [39,97].

Signes cliniques d'une surcharge en cuivre

Lors de surcharge en cuivre, on a principalement des troubles digestifs hépatiques et neurologiques. Les principaux signes cliniques sont :

- une irritation de la paroi des intestins, voire une érosion,
- une anémie,
- une hypotension,
- un ictère,
- un coma, un choc et la mort.

Lors d'une intoxication aigüe une détresse hépatique et/ou rénale peut se développer en quelques jours [12,24,62].

IV. Les données actuelles sur le métabolisme du cuivre et ses facteurs de variations, chez le chien

Chez le chien, très peu d'études ont été réalisées, nous avons donc très peu de données. De plus les études disponibles ont été réalisées quasiment exclusivement sur des beagles servant à l'expérimentation.

A. Variations pré-analytiques

1. Les composants sanguins

Chez le chien, la concentration en cuivre dans le sérum est deux fois plus faible que chez l'homme (322 +/- 139 ng/mL chez le chien). Le cuivre est lié aux mêmes protéines mais dans des proportions différentes : il est majoritairement lié à la transcupréine [105] (Tableau 4).

Composant	Proportion de cuivre	
	µg/l	%
Céruloplasmine	135-180	37-49
Albumine	29	8
Transcupréine (macroglobuline)	150-200	41-54
Protéines de faible poids moléculaire	6	2

Tableau 4 : Protéines de transport plasmatique du cuivre, chez le chien (d'après [105]).

2. L'hémolyse

Des dosages de la concentration en cuivre dans le sérum ont été réalisés sur 800 beagles. L'hémolyse ne semble pas influencer la concentration en cuivre dans le sérum [106,107].

3. La lipémie

Des dosages de la concentration en cuivre dans le sérum ont été réalisés sur 800 beagles. Certains prélèvements présentaient visuellement une lipémie importante. Le dosage a cependant été effectué et la lipémie ne semble pas avoir d'influence sur la concentration en cuivre dans le sérum [106,107].

B. Variations physiologiques

1. Le sexe

Des dosages de la concentration en cuivre dans le sérum ont été réalisés sur 800 beagles. Dans cette étude il apparait que la concentration en cuivre dans le sang est significativement plus élevée chez les mâles (0.780 +/- 0.095 µg/mL) que chez les femelles (0.702 +/- 0.094 µg/mL), contrairement à ce que l'on retrouve chez l'homme. Cette étude n'a cependant été réalisée que chez des beagles [106].

2. Les races

De faibles variations de concentration plasmatique en cuivre ont été mises en évidence entre différentes races de chiens. Soixante-douze chiens de laboratoire sains, de sept races différentes ont été prélevés. La concentration en cuivre a été dosée.

Une différence significative a été mise en évidence entre le caniche (0.77 +/- 0.04 µg/mL c'est à dire la concentration la plus faible) et le berger allemand (0.89 +/- 0.03 µg/mL c'est à dire la concentration la plus élevé). Entre les autres races, les différences n'ont pas été significatives [108].

3. L'âge

Chez le chien la concentration en cuivre augmente d'environ 20% entre 2.5 et 5 ans, puis diminue (Figure 9). Cette étude a été réalisée sur 800 beagles [107].

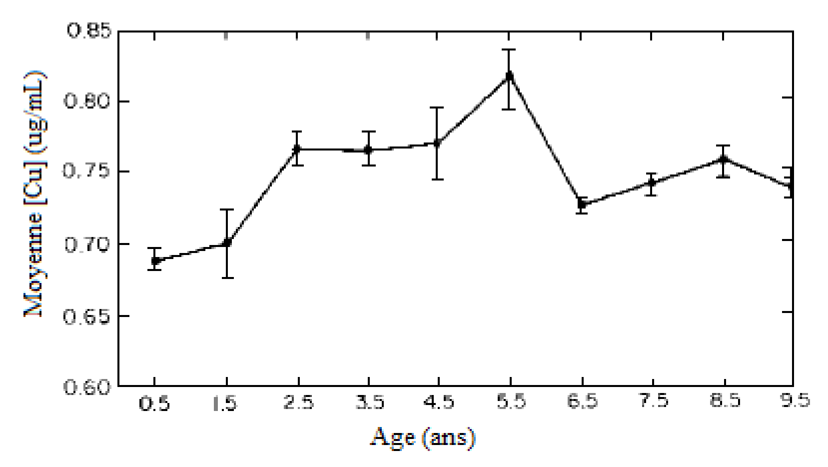


Figure 9 : Variations du cuivre en fonction de l'âge chez le chien (d'après [107])

4. La castration

Chez les mâles, la concentration sérique de cuivre est significativement plus basse chez les mâles castrés, avec une concentration moyenne en cuivre de 0.78 +/- 0.06 µg/mL, que chez le chien entier, et de 0.718 +/- 0.095 µg/mL, chez le chien castré, respectivement. On a alors une concentration moyenne proche de celle des femelles (0.702 +/- 0.094 µg/mL). Cette étude a été réalisée sur 800 beagles [106].

5. Le stress

Lors de stress, le taux de cuivre dans le sang semble diminuer légèrement (de 4%). Dans cette étude, sur 800 beagles, la moitié des chiens étaient prélevés ponctuellement,

alors que l'autre moitié a été prélevée tous les mois. On suppose donc que les chiens prélevés tous les mois pendant un an se sont habitués et donc sont moins stressés [106].

C. Variations pathologiques

1. Pathologies non spécifiques

Excès de cuivre

La concentration en cuivre chez le chien augmente lors de processus tumoral, d'infections chroniques et d'épilepsie (de respectivement 1, 7 et 4%)[106].

Cependant, lors de dermatite chronique et de troubles hépatiques, il n'y a pas de variations [106].

Déficit en cuivre

Lors de malabsorption ou d'entéropathie avec perte de protéines, la concentration plasmatique en cuivre diminue [106].

2. Hépatite par surcharge en cuivre

De nombreux désordres du stockage en cuivre ont été identifiés, chez le chien. On les retrouve principalement dans certaines races telles que le Bedlington terrier, le West highland white terrier, le dalmatien, le doberman et le labrador retriever.

Toutes ces maladies sont caractérisées par une accumulation en cuivre dans le foie entrainant une inflammation voir une cirrhose hépatique. Cependant, il existe des différences quant à leur intensité, leur épidémiologie et leur gravité [10] (tableau 5).

	Bedlington	Labrador	Dobermann	WHW terrier	Dalmatien
Gène	COMMD1				
Mode de transmission	Autosomiale récessive	Complexe	Complexe		
Prédisposition sexuelle	Non	Femelles	Femelles	Non	Non
Age d'apparition	Adolescent- age moyen	Adolescent- age moyen	Adolescent- age moyen	Age moyen- vieux chien	Adolescent- age moyen
Pathologie hépatique	Cirrhose	Cirrhose	Cirrhose	Cirrhose	Cirrhose
Augmentation de cuivre par rapport aux valeurs usuelles dans le foie (<400ug/g)	50 x	10 x	10 x	20 x	20x
Taux de céruloplasmine dans le sang	Normal à augmenté				
Influence de l'alimentation	Mineure	Majeure			

Tableau 5 : Les hépatites cupriques chez les chiens (d'après [10]). Avec WHW terrier, le West Highland White terrier

D'un point de vue histologique, ces maladies par surcharge sont peu différentes car l'accumulation de cuivre commence toujours dans la zone centrolobulaire hépatique [10].

Les signes cliniques sont ceux d'une hépatite, avec :

- une diminution de l'appétit,
- des vomissements,
- un abattement,
- une perte de poids,
- de la diarrhée (parfois),
- une PuPd [109].

Le traitement par des chélateurs du cuivre (pénicillamine ou 2.3.2 tetramine) diminue la quantité de cuivre dans le foie, chez les chiens atteints. L'efficacité de ce traitement dépend de la race touchée. Chez certains chiens, il est possible d'atteindre des concentrations cupriques hépatiques normales (< 400 µg/g) [10].

Le cas du Bedlington terrier

La maladie du Bedlington terrier est une maladie autosomale récessive touchant le gène exprimant COMMD1, ce qui réduit de manière drastique l'excrétion biliaire du cuivre [10,110-111]. L'excès de cuivre est alors stocké dans les lysosomes des hépatocytes. On a une concentration sanguine en céruloplasmine normale, contrairement à ce que l'on observe dans la maladie de Wilson, chez l'homme [35].

Cette maladie reste cependant complexe car les chiens possédant deux gènes normaux de COMMD1 peuvent tout de même être atteints. Il y a donc probablement un autre gène non identifié qui est impliqué [10].

La maladie se déclare autour de 2 à 5 ans d'âge [11].

Une hépatite chronique s'installe progressivement et on observe alors des concentrations cupriques très élevées dans les hépatocytes (jusqu'à 15 000 µg/g de matière brute, soit 50 fois la quantité normale) [10]. A terme, cela entraine une cirrhose hépatique [35].

L'exclusion de la reproduction des Bedlington en fonction d'un test génétique, disponible aux Etats-Unis chez VetGen, ou encore en Australie chez Gentest, a permis de diminuer la prévalence de la maladie dans cette race [10].

<u>L'hépatite du labrador retriever</u>

L'hépatite du labrador retriever est une maladie complexe et héréditaire (85% d'héritabilité). Le cuivre s'accumule progressivement dans le foie au cours des années, d'abord de manière asymptomatique puis l'animal décompense brusquement [10].

Elle se déclare chez les adultes et plutôt chez les vieux chiens et est généralement fatale en quelques mois. Les femelles sont prédisposées [109].

Il a été montré qu'une alimentation riche en cuivre et pauvre en zinc augmente de manière significative le risque de développer une hépatite, chez le labrador [112].

Le risque de déclarer la maladie augmente durant la période post-partum. Les hormones ou le stress pourraient accélérer la vitesse de dégradation de la fonction hépatique lors de la gestation et de la lactation. Cela n'a cependant pas été démontré [10].

<u>La maladie du West Highland White terrier</u>

La maladie du West Highland White terrier a clairement une distribution familiale et n'a pas de prédisposition sexuelle. On ne connait rien de plus [10].

<u>La maladie du Doberman</u>

Les dobermans présentent parfois une forme sévère d'hépatite et de cirrhose, avec surcharge cuprique. Elle se retrouve de façon quasi exclusive chez les femelles, et l'issue est souvent fatale en quelques semaines ou quelques mois [10].

Il est possible que cette maladie soit une maladie auto-immune [10].

<u>La maladie du Dalmatien</u>

La maladie du Dalmatien est une maladie héréditaire avec un stockage du cuivre dans les hépatocytes. Il ne semble pas avoir de prédisposition sexuelle.

Cette maladie est présente en Europe mais la prévalence n'est pas connue [10].

Dans cette première partie nous avons donc étudié les bases du métabolisme du cuivre pour mieux comprendre ses variations. Il apparait que la concentration en cuivre dans l'organisme est finement régulée et les variations observées sont plutôt d'ordre inter-individuelle que intra-individuelle.

PARTIE II :
ETUDE EXPERIMENTALE DES FACTEURS DE VARIATION PRE-ANALYTIQUE DU DOSAGE DU CUIVRE DANS LE SANG

Comme vu précédemment les facteurs pré-analytiques peuvent être des sources de variations. Très peu d'articles sont disponibles sur le sujet, notamment chez le chien. Nous avons donc essayé d'identifier plus précisément quels étaient leur influence sur nos mesures.

I. Principes généraux des expériences réalisées

A. Le dosage

Pour toutes ces expériences les dosages ont été effectués sur du plasma, par spectrophotométrie d'absorption à l'aide de la machine SOLAAR AA Series version 9.12 couplée au passeur CETAC ASX 510. Avant dosage 0.5 mL d'acide nitrique est ajouté au millilitre de plasma de l'échantillon. Après 10 min les échantillons sont dilués au 4.5^{éme} par l'ajout de 3mL d'eau distillée, puis centrifugés. Le dosage est effectué sur le surnageant (Figure 10).

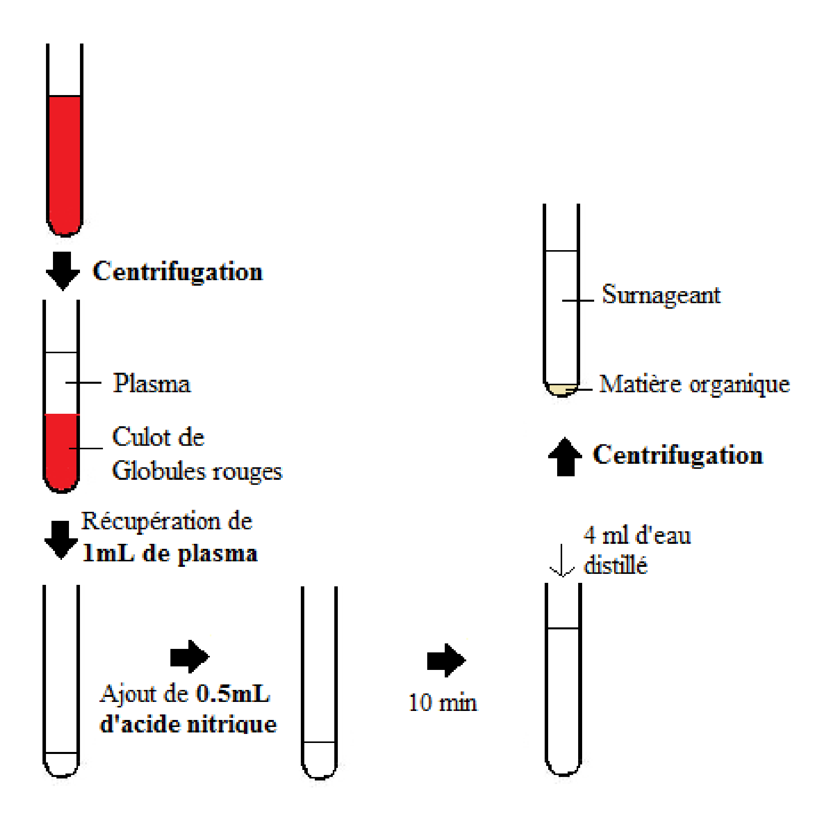


Figure 10 : Illustration des transformations réalisées préalablement au dosage de cuivre par spectrométrie d'absorption. Les opérations réalisées permettent d'éliminer la matière organique (voir précédemment).

B. Limiter l'hémolyse

Bien que chez le chien l'hémolyse ne semble pas interférer avec le dosage du cuivre [106,107], nous voulons la limiter au maximum pour faire varier chaque paramètre individuellement.

Pour cela nous avons utilisé des aiguilles de diamètre 22G, étant le diamètre le plus important à notre disposition [113].

La taille du tube est également importante : en effet plus le tube est grand, plus la quantité de vide qu'il contient est grande et donc plus la vitesse du sang prélevé est élevée, ce qui augmente le risque d'hémolyse [114]. Nous avons donc privilégié les tubes de petits volumes, cependant assez grand pour récupérer facilement 1mL de plasma : les tubes de 4mL nous ont offerts le meilleur compromis.

De la même manière nous avons voulu éviter toutes manipulations inutiles (prise de sang à la seringue transférée dans un tube ou encore fractionnement d'un grand tube dans plusieurs tubes de plus petit volume).

Le but de ces expériences été d'approcher au plus près les conditions que nous rencontrerons dans la clinique de l'ENVT.

C. La quantité prélevée

En médecine humaine, la limite maximale d'un prélèvement sanguin unique est de 6% du volume total circulant (soit 10% du poids vif). Les hommes ne doivent pas redonner leur sang dans le mois qui suit.

Nous avons décidé d'extrapoler cela au chien et donc de ne pas dépasser un maximum de 6mL/kg. Tous nos chiens ne seront pas re-prélevés dans le mois qui suit.

D. Analyse statistique

L'influence des paramètres pré-analytiques sur la concentration en cuivre a été réalisée à l'aide du logiciel R (version 3.0.1) par des ANOVA à un facteur. Les différences obtenues ont été considérées comme significative avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

II. Influence de la méthode de conservation

Lors de notre étude les prélèvements sanguins seront effectués au service de médecine préventive de l'ENVT puis centrifugés par nos soins. Dans ces conditions là, la centrifugation ne pourra pas être immédiate. Il nous faut donc savoir quelles sont les modalités de conservation optimales entre le moment du prélèvement et le moment de la centrifugation et si leurs non respect a un impact important sur nos résultats.

A. Matériel et méthodes

Cette expérience a été réalisée sur un chien labrador apparemment sain de 30 kg (labrador). 21 tubes héparinés de 4mL ont été prélevés aux jugulaires, en 5 ponctions différentes, au même moment.

Ces vingt-et-un tubes ont été répartis en 3 groupes de 7 tubes, de manière aléatoire afin d'homogénéiser les groupes de départ, et d'ainsi éviter les variations dues aux prélèvements multiples.

Les tubes sont alors identifiés et conservés de trois différentes manières (Figure 11) :

- Groupe 1 : Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 2 heures après le prélèvement

- Groupe 2 : Les tubes sont mis au réfrigérateur à 4°C immédiatement après le prélèvement et y restent pendant 2 heures.

- Groupe 3 : Les tubes sont laissés à température ambiante pendant une heure après le prélèvement, puis mis au réfrigérateur à 4°C pendant une heure.

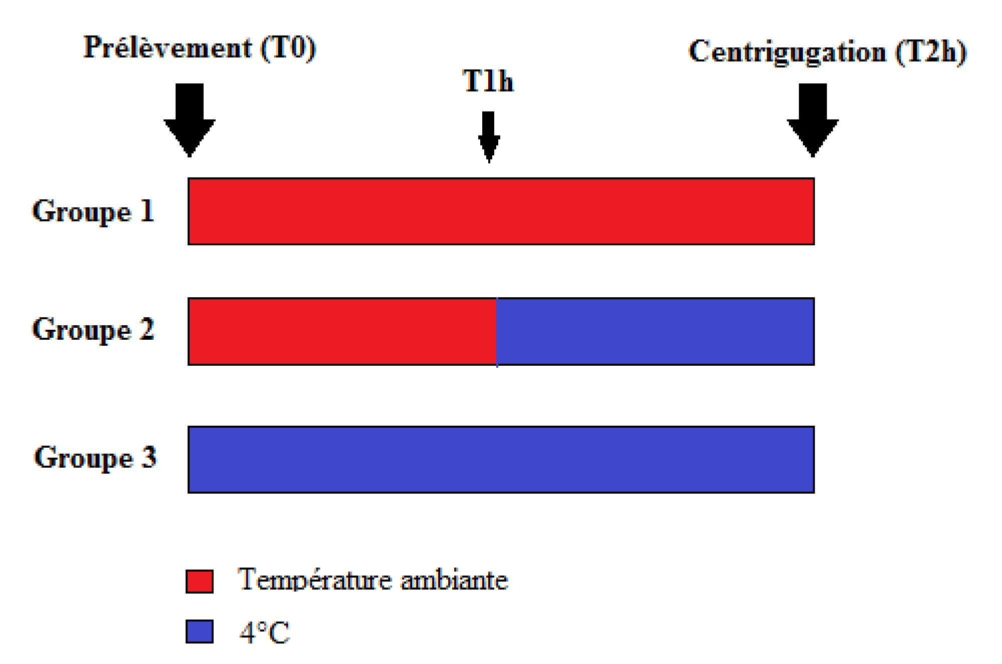


Figure 11 : Influence de la méthode de conservation des prélèvements avant centrifugation sur le dosage du cuivre, illustration des trois groupes constitués

Les prélèvements ont ensuite été centrifugés à chaud (machine eppendorf centrifuge 5702 à 4000 tours pendant 10 min).

Certains des tubes ont été malgré tout hémolysés. Ces tubes là ont été tout de même analysés, après une évaluation subjective du taux d'hémolyse, classé de 0 (non hémolysé) à 2 (très hémolysé).

Nous avons alors prélevé 1mL de plasma de chaque tube et les plasmas ont été analysés par la méthode décrite précédemment.

Un tube du groupe 1 et deux tubes du groupe 2 ont été exclus de l'étude car nous n'avons pas put prélever 1mL de plasma.

B. Résultats

Les trois groupes étudiés ne sont pas significativement différents (Figure 12).

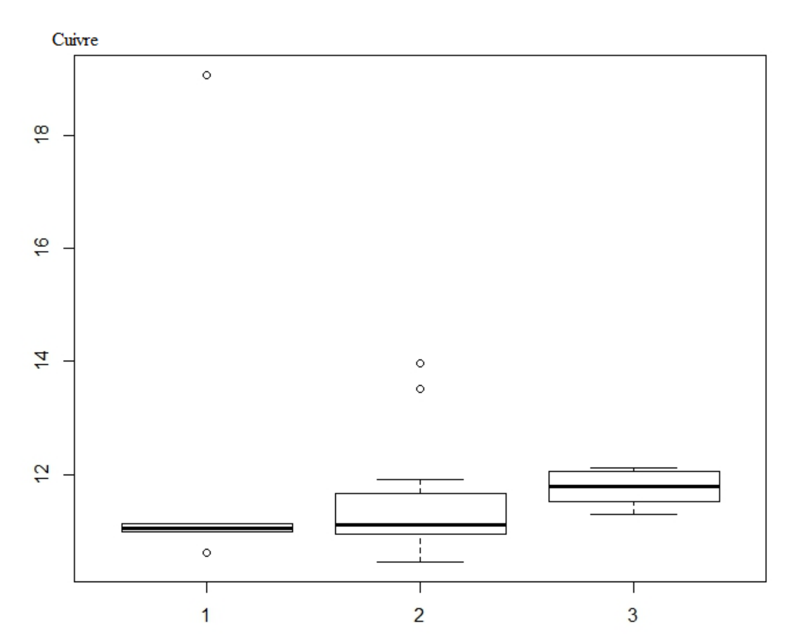


Figure 12 : Effet du mode de conservation entre le prélèvement et la centrifugation sur la concentration en cuivre. Groupe 1 : Les tubes sont laissés 2h à température ambiante ; groupe 2 : les tubes sont laissés 2h au réfrigérateur ; groupe 3 : les tubes sont laissés 1h à température ambiante puis 1h au réfrigérateur. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L. Les moyennes sont représentées sur ce graphique.

L'hémolyse ne modifie pas de manière significative les résultats.

C. Conclusion

La méthode de conservation des tubes n'a pas d'influence sur le taux de cuivre dans le tube. Nous pouvons donc prendre tous les prélèvements sans se soucier de leur méthode de conservation. Nous les conserverons cependant à 4°C immédiatement après la ponction.

Ces résultats ne sont valables que pour un temps de conservation de 2h. Si ce temps est inférieur on peut supposer que les résultats ne seront pas modifiés. On ne peut cependant pas extrapoler cela à des durées de conservation plus importante pour lesquelles le comportement est inconnu.

Lors de cette expérience et malgré toutes nos précautions, certains tubes ont été hémolysés. Cela ne semble pas avoir modifié nos résultats.

III. Influence de la méthode de centrifugation

Les prélèvements sanguins seront effectués au service de médecine préventive, réfrigérés puis centrifugés. Il existe deux types de centrifugeuse : des centrifugeuses à chaud (plus commodes à utiliser et disponible aux cliniques de l'ENVT) et des centrifugeuses à froid (disponible uniquement dans le laboratoire d'alimentation).

Nous pouvons avoir accès à ces deux types de centrifugeuses, il est donc important de savoir si les résultats obtenus par centrifugation avec l'une ou l'autre de ces machines sont équivalents, ou, le cas échéant, quelle centrifugeuse il vaut mieux utiliser.

A. Matériel et méthodes

Cette expérience a été réalisée sur une chienne bouvier bernois apparemment saine de 51 kg. 12 tubes héparinés de 4mL ont été prélevés aux jugulaires, en 3 ponctions différentes, au même moment.

Ces douze tubes ont été répartis en 2 groupes de 6 tubes, de manière aléatoire afin d'homogénéiser les groupes de départ, et d'ainsi éviter les variations dues aux prélèvements multiples.

Les tubes ont alors été identifiés, réfrigérés pendant une heure, puis centrifugés avec l'une des deux machines, à 4000 tours pendant 10 min :

- Groupe 1 : Les tubes sont centrifugés à chaud à l'aide de la centrifugeuse eppendorf centrifuge 5702

- Groupe 2 : Les tubes sont centrifugés à froid à l'aide de la centrifugeuse Sigma 3K15 bioblock scientific

Certains des tubes ont été hémolysés. Ces tubes là ont été tout de même analysés, après une évaluation subjective du taux d'hémolyse, classé de 0 (non hémolysé) à 2 (très hémolysé).

Nous avons alors prélevé 1mL de plasma de chaque tube et les plasmas ont été analysés d'après la méthode décrite précédemment.

Un tube du groupe 2 a été exclu de l'étude car nous n'avons pas put prélever 1 mL de plasma.

B. Résultats

La méthode de centrifugation, à chaud ou à froid, n'a pas d'influence sur la concentration en cuivre (p = 0.383)(Figure 13).

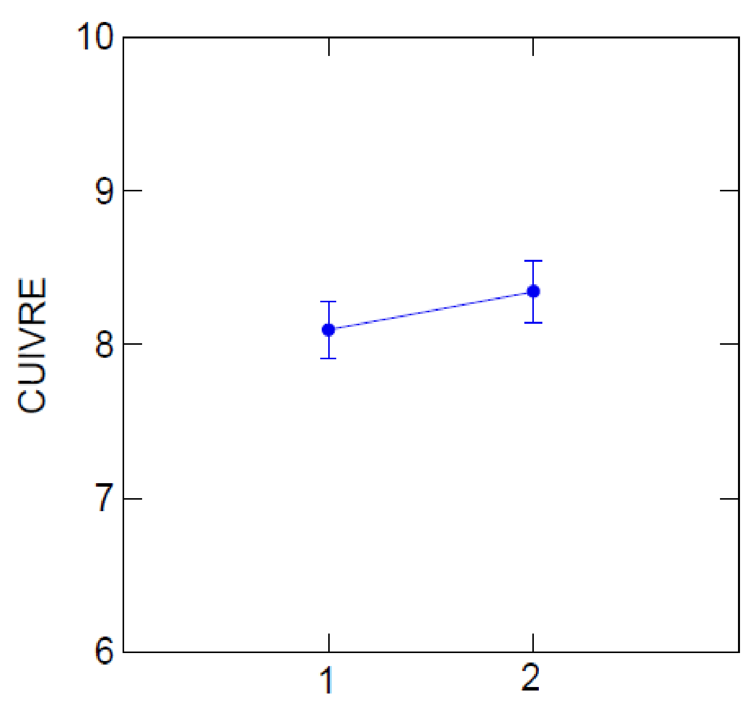


Figure 13 : Effet du mode de centrifugation sur la concentration en cuivre. Groupe 1 : les tubes ont été centrifugés à chaud ; Groupe 2 : les tubes ont été centrifugés à froid. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L. Les moyennes sont représentées sur ce graphique.

C. Conclusion

La méthode de centrifugation n'a pas d'influence sur le taux de cuivre dosé. Nous utiliserons donc la centrifugeuse à chaud eppendorf centrifuge 5702, accessible en clinique.

IV. Influence du temps d'attente avant centrifugation

Les prélèvements sanguins ont été effectués au service de médecine préventive, réfrigérés et centrifugés par nos soins. La durée entre le prélèvement et la centrifugation peut être variable d'un échantillon à l'autre ; il est donc important de s'assurer que cela n'a pas trop d'impact sur les résultats obtenus, ou, le cas échéant, dans quelle mesure. En effet nous avons vu précédemment que lorsque le délai d'attente était d'une semaine, nous observions des variations majeures dans la concentration en cuivre [66]. Il nous faut donc savoir si cela est également valable sur des durées beaucoup plus courtes, que nous observerons en clinique.

A. Matériel et méthodes

Cette expérience a été réalisée sur un chien apparemment sain de 52 kg. Huit tubes hépariné de 4 mL ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire, en une ponction, au même moment.

Ces huit tubes ont été répartis en 4 groupes de 2 tubes, de manière aléatoire afin d'homogénéiser les groupes de départ, et d'ainsi éviter les variations dues aux prélèvements multiples.

Les tubes ont alors été identifiés, réfrigérés, puis centrifugés à différents moments (Tableau 6).

N° de tube	Temps prélèvement-centrifugation
1	10 min
2	20 min
3	1h
4	2h

Tableau 6: Influence du temps entre le prélèvement et la centrifugation sur le dosage du cuivre. L'expérience a été réalisée deux fois pour la reproductibilité des résultats.

Les tubes prélevés n'ont pas été hémolysés. Nous avons alors prélevé 1mL de plasma de chaque tube et les plasmas ont été analysés d'après la méthode décrite précédemment.

B. Résultats

On observe une diminution de la concentration en cuivre entre 10 et 20 min de conservation. Cette concentration reste par la suite stable pendant 40 minutes puis au bout de 1h elle chute à nouveau. Les différences observées ne sont pas significatives (Figure 14).

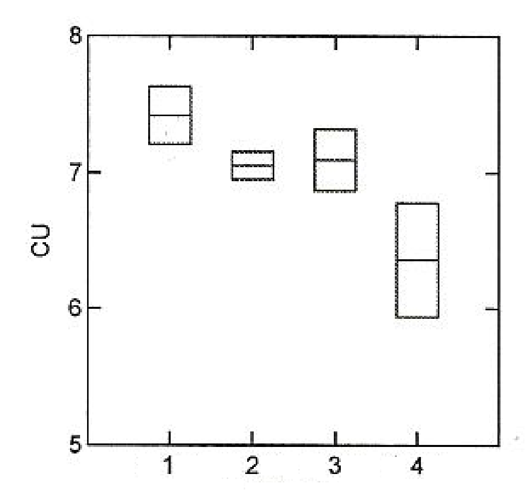


Figure 14: Influence du délai prélèvement-centrifugation sur la concentration en cuivre . Groupe 1 : délais de 10 min ; groupe 2 : délais de 20 min ; groupe 3 : délais de 1h ; groupe 4 : délai de 2h. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L.

C. Conclusion

Le temps de latence entre le moment du prélèvement et le moment de la centrifugation n'a pas d'influence significative sur la concentration en cuivre. Le graphique nous montre cependant une tendance à la diminution de la concentration en cuivre après 1h. Nous centrifugerons nos échantillons dans un délai de 20 à 60 min après le prélèvement.

V. Influence de l'hémolyse

Lors de nos prélèvements il est possible que certains tubes soient hémolysés. Il est donc important de pouvoir quantifier l'hémolyse de manière objective et de savoir si elle a une influence sur les résultats. D'après les articles mentionnés précédemment cela ne semble pas être le cas. Les expériences ayant été réalisées sur du sérum et non sur du plasma il nous faut cependant vérifier cela.

A. Une gamme d'hémolyse

1. Matériel et méthodes

Cette expérience a été réalisée sur 3 chiens apparemment sains :

- 1 tube hépariné de 4 mL a été prélevé sur une chienne bouvier bernois (ëlka) de 52 kg en une ponction,
- 12 tubes héparinés de 4 mL ont été prélevés sur Faia, chienne beauceron de 32.2kg en une ponction,
- 11 tubes héparinés de 4 mL ont été prélevés sur Gaia, chienne dogue allemand de 58.3kg en 2 ponctions, réalisées au même moment.

Les échantillons sanguins ont été centrifugés immédiatement, et leur plasma séparé de leur culot de globule rouge. A la limite plasma/culot il est difficile de bien séparer ces deux parties, cette phase intermédiaire a donc été jetée.

Tous les plasmas des différents prélèvements ont été mis ensemble, ainsi que tous les culots de globules rouges, de manière à obtenir un pool de plasma de 40 mL et un pool de globules rouges de 38 mL.

Deux millilitres d'eau pure a été ajoutée au pool de globule rouge, ce qui a créé un choc osmotique, et donc une lyse totale des globules rouges.

Nous avons ensuite reconstitué des tubes avec une proportion plus ou moins importante de globules rouges, en restant dans les normes physiologiques (Tableau 7). Nous avons mélangé avec précaution les tubes obtenus puis nous les avons à nouveau centrifugés (Figure 15).

Les tubes ainsi créés, des photographies de l'échelle de couleur obtenue ont été réalisées pour pouvoir par la suite, à l'aide de la couleur des tubes, estimer le taux d'hémolyse de nos prélèvements (Figure 16).

Pour finir nous avons prélevé 1mL de plasma de chaque tube et les plasmas ont été analysés d'après la méthode décrite précédemment.

N° de tube	plasma (mL)	Globule rouge (mL)	tubes
1	2	0	2
2	1,9	0,1	2
3	1,8	0,2	3
4	1,7	0,3	3
5	1,6	0,4	3
6	1,4	0,6	3
7	1,2	0,8	3
8	1	1	3
9	0,8	1,2	3

Tableau 7 : Reconstitution des tubes avec différentes proportions de plasma et de globules rouges. Chaque tube final contient 2 mL.

Sang total

Centrifugation

Plasma

Culot de
Globules rouges

Pool de
plasma

Pool de
Globules rouges

Schema 1

2mL d'eau pure
-> Lyse totale

Pool de
plasma

Pool de
Globules rouges

Plasma

Culot de
Globules rouges

Mélanger

Schema 2

Figure 15 : Réalisation d'une gamme d'hémolyse. Schéma 1 : Les tubes de sang sont centrifugés pour créer un pool de plasma et de globules rouges. Schéma 2 : Les globules rouges sont hémolysés à l'aide de 2mL d'eau pure, puis des tubes de 2mL sont reconstitués avec différentes quantités de globules rouges et de plasma créant ainsi une gamme d'hémolyse

2. Résultats

➢ *La gamme d'hémolyse :*

Les tubes sont numérotés de 1 (non hémolysé) à 9 (très hémolysé)



Figure 16 : Gamme d'hémolyse

➢ *Influence de l'hémolyse sur les dosages :*

Une légère hémolyse ne modifie pas de manière significative la concentration en cuivre (Figure 17).

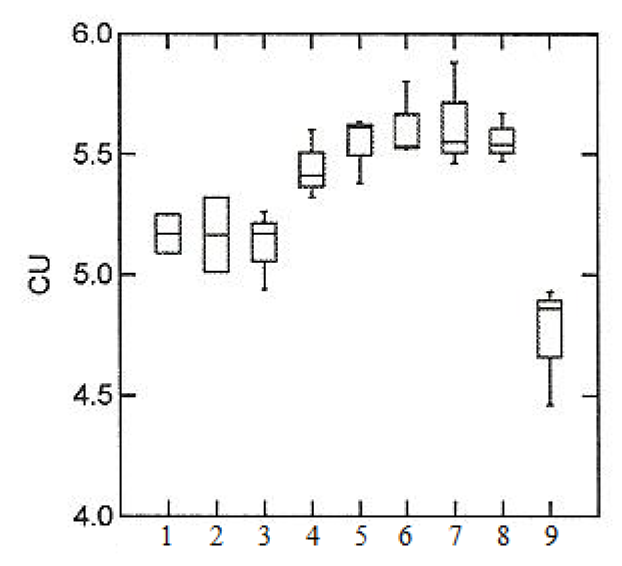


Figure 17: Influence de l'hémolyse sur la concentration en cuivre. Les numéros correspondent à la gamme d'hémolyse réalisée précédemment. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L.

3. Conclusion

L'hémolyse ne semble pas avoir une influence sur la concentration en cuivre. Cependant beaucoup de manipulation ont été réalisées et la composition initiale de chaque tube n'est pas identique, il est donc possible qu'il y ait un biais dans cette expérience.

La gamme d'hémolyse réalisée permettra d'estimer le taux d'hémolyse de manière objective.

B. L'influence de l'hémolyse

1. Matériel et méthodes

Cette expérience a été réalisée sur onze chiens apparemment sains de plus de 20 kg. Cinq tubes héparinés de 4 mL ont été prélevés aux veines jugulaires, en une ponction, au même moment, à chaque chien, mise à part un chien pour lequel seulement 4 tubes ont été prélevés.

Les onze chiens ont été répartis en 2 groupes :

- Groupe 1 : Trois chiens ont été inclus dans ce groupe. Les 5 tubes n'ont subit aucune transformation.

- Groupe 2 : Les 8 autres chiens ont été inclus dans ce groupe. Les tubes ont été secouées de manière énergétique pendant un temps donné plus ou moins long, afin d'hémolyser les prélèvements (voir tableau 8)

N° de tube	Temps de mélange
1	0
2	10s
3	30s
4	1 min
5	5 min

Tableau 8: Temps de mélange des tubes du groupe 2

Les tubes sont alors réfrigérés, puis centrifugés. Le taux d'hémolyse est quantifié à l'aide de la gamme d'hémolyse précédemment réalisée. Aucun tube du groupe 1 n'est hémolysé.

Nous avons alors prélevé 1 mL de plasma de chaque tube et les plasmas ont été analysés d'après la méthode décrite précédemment.

2. Résultats

Les tubes ont été séparés en 4 groupes pour lesquels une note d'agitation a été attribuée. Une note d'agitation de 1 correspond à tube d'hémolyse 1, c'est-à-dire n'ayant pas été hémolysé et une note d'agitation de 4 correspond à un taux d'hémolyse de 4 ou plus.

Il n'y a pas de différence significative dans le groupe 1.
Il n'y a pas de différence significative en fonction du taux d'hémolyse (Figure 18).

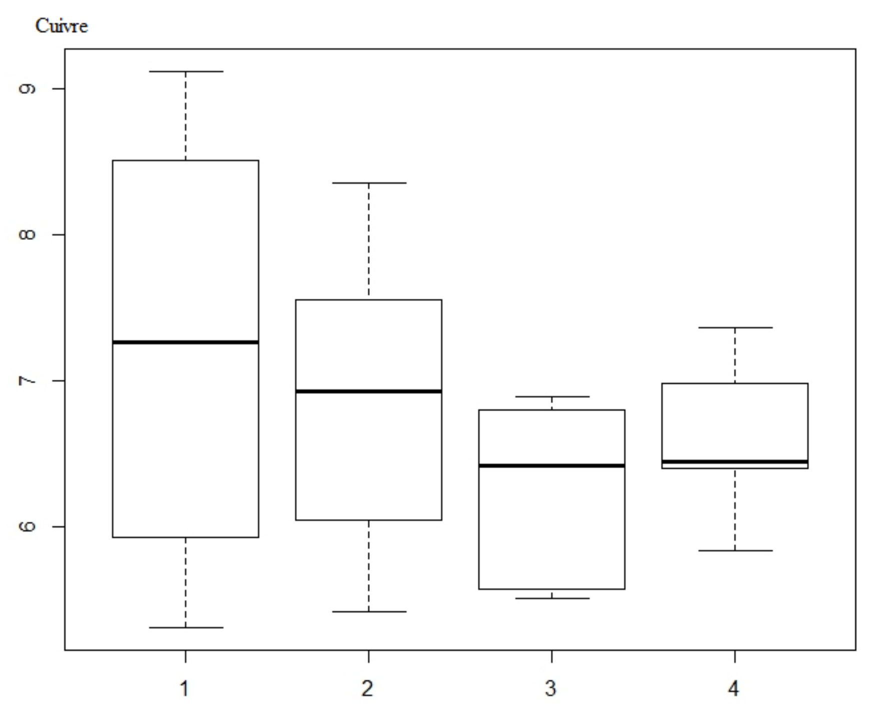


Figure 18: Effet du taux d'hémolyse sur la concentration en cuivre. Groupe 1 : Les tubes n'ont pas été agités ; groupe 2 : La note d'agitation est de 2 ; groupe 3 : La note d'agitation est de 3 ; Groupe 4 : la note d'agitation est de 4 ou plus. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L. Les moyennes sont représentées sur ce graphique.

3. Conclusion

La concentration en cuivre des tubes du groupe 1 n'est pas significativement différente de celle des autres groupes. Le fait de prélevé plusieurs tubes lors d'une seule et même ponction (prélèvements multiples) ne modifie pas de manière significative les résultats. On peut donc supposer que lorsque nous prélevons plusieurs tubes en une ponction, la composition initiale en cuivre est la même pour chaque tube.

L'hémolyse n'a pas d'influence sur la quantité de cuivre dosé. Lors de ce test, l'hémolyse est bien le seul facteur de variation, ces résultats sont plus fiables. Nous considérerons donc par la suite que l'hémolyse n'interfère pas avec le dosage du cuivre et les tubes légèrement hémolysés ne seront pas exclus de cette étude. Ce facteur sera cependant quantifié grâce à la gamme d'hémolyse réalisée précédemment.

PARTIE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE DU TAUX DE CUIVRE DANS LE SANG CHEZ LE CHIEN APPARAMENT SAIN ET DE SES FACTEURS DE VARIATION

I. Matériel et méthodes

A. Population des chiens étudiés et prélèvements sanguins

1. Critères utilisés

Cette étude inclut 150 chiens et a été réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Parmi ces chiens, 133 ont été présentés en médecine préventive pour leur vaccination annuelle ou en reproduction en vue d'une stérilisation, les 17 restants provenant du chenil de physiologie.

Tous les chiens inclus dans cette étude sont considérés comme apparemment sains après un examen clinique conduit systématiquement avant chaque prise de sang. Ils n'ont pas reçus de traitement dans le mois précèdent.

Pour chaque chien, le propriétaire a dû remplir un questionnaire indiquant l'âge, la race, la robe, le sexe et une éventuelle stérilisation, ainsi que la date où celle-ci a eu lieu. Il est également demandé si le chien a pris des contraceptifs au cours de sa vie, en précisant la molécule utilisée. De plus, il indique l'activité de son chien, son mode de vie (la présence d'un jardin ou non, la présence d'autres animaux, s'il joue ou est en contact avec un quelconque métal, …), ses habitudes alimentaires (type et marque de nourriture, nombre de repas par jour, quantité de nourriture par repas, moment du dernier repas et la provenance de l'eau de boisson) et la date et le produit de la dernière vermifugation.

Le « Body Condition Scoring » (BCS) a été évalué par nos soins sur tous les chiens. Les principaux critères d'évaluation sont la présence de dépôts graisseux sur les vues latérales et dorsales des côtes, des vertèbres lombaires et des autres saillies osseuses, la présence d'une taille marquée, d'un abdomen gonflé ou distendu, la quantité de graisse sous-cutanée, les autres dépôts graisseux et les éventuelles pertes de masses musculaires.

Un BCS de 4/9 ou 5/9 correspond à une morphologie idéale. Les animaux possédant un BCS de 1 à 3 sur 9 sont considérés comme maigres alors que les animaux possédant un BCS allant de 6 à 9/9 sont en surpoids voire obèses [115].

Pour chaque chien, le poids idéal a été évalué par nos soins en le calculant à partir du poids réel et du BCS:

- Un BCS de 1/9 : poids réel = poids idéal – 20% poids idéal
- Un BCS de 2/9 : poids réel = poids idéal – 15% poids idéal
- Un BCS de 3/9 : poids réel = poids idéal – 10% poids idéal
- Un BCS de 4 ou 5/9 : poids réel = poids idéal
- Un BCS de 6/9 : poids réel = poids idéal + 10% poids idéal
- Un BCS de 7/9 : poids réel = poids idéal + 20% poids idéal
- Un BCS de 8/9 : poids réel = poids idéal + 30% poids idéal
- Un BCS de 9/9 : poids réel = poids idéal + 40% poids idéal

Note BCS	Palpation du squelette	Répartition du tissu adipeux Observation de la silhouette
1 = Emacié	Côtes, vertèbres, bassin et saillies osseuses visibles à distance	Pas de graisse discernable, fonte musculaire extrême
2 = Très maigne	Côtes, vertèbres, bassin bien visibles, autres saillies osseuses éventuellement visibles	Pas de graisse palpable, perte minime de muscle
3 = Maigre	Côtes facilement palpables voire visibles, apophyses épineuses des vertèbres lombaires visibles, os du bassin proéminents	Pas de tissu adipeux sous cutané recouvrant les côtes
4= Fin	Côtes facilement palpables voire visibles, apophyses épineuses des vertèbres lombaires visibles, os du bassin proéminents	Graisse de couverture minimale
5 = Optimal	Côtes palpables	Pas d'excès de graisse sous cutanée recouvrant les côtes
6= Surcharge	Côtes palpables	Léger excès de graisse recouvrant les côtes
7 = Gros	Côtes difficiles à palper	Graisse déposée sur les côtes, les lombes et la base de la queue
8= Obèse	Côtes palpables en excerçant une forte pression	Fort dépôt de graisse sur les côtes, les lombes et la base de la queue
9= Très obèse	Côtes non palpables	Dépôt majeur de graisse sur le thorax, rachis, base de la queus, encoulure, membres et face

Tableau 9: Principaux critères de détermination du BCS (Body Score Condition) par inspection visuelle chez le chien [115].

La présence de troubles dermatologiques et leur identification précise est également réalisée par nos soins.

Les prélèvements de sang ont été réalisés par ponction à la veine jugulaire sur tube hépariné de 4 mL. Ils ont ensuite été placés à 4°C et centrifugés 20 à 60 min après, pendant 10 minutes à 4000 tours/min et à température ambiante. Un millilitre de plasma a été prélevé et le taux d’hémolyse a été évalué grâce à la gamme d’hémolyse réalisée précédemment. Les plasmas ainsi obtenus ont ensuite été conservés à 4°C jusqu’au moment des analyses, réalisées une fois par semaine. Les plasmas ont subit le même traitement que précédemment.

2. <u>Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée</u>

Au sein de la population étudiée, 63 chiens étaient des mâles dont 19 étaient castrés (12.7%) et 87 étaient des femelles dont 35 étaient stérilisées (23.3%). La majorité des chiens (42%) étaient de jeunes adultes entre 1 et 3 ans, 29.3% (44 chiens) avaient moins de 1 an, 26% (39 chiens) avaient entre 3 et 8 ans et 2.7% (4 chiens) étaient plus vieux (environ 8 ans et plus). L'âge moyen des chiens est de 2.7 ans.

Une forte proportion (67.3%) de chiens de race a été observée ; 45 races différentes étaient représentées, réparties de façon prépondérante sur quatre groupes raciaux (le groupe cynophile 6 des chiens courants avec 21.8% soit 22 chiens, le groupe 1 (chiens de berger) avec 18.8% soit 19 chiens, et les groupes 2 (Pinscher, schnauzer et molossoïdes) et 9 (chiens d'agrément et de compagnie) avec tous deux 12.9% soit 13 chiens. Les groupes 3 (chiens de terrier), 7 (chiens d'arrêt) et 8 (Spaniels, retrievers et chiens d'eau) étaient représentés un peu mois souvent (respectivement 10, 8, et 9 chiens soit 9.9%, 7.9% et 8.9% et 12%) et les groupes cynophiles 5 (chiens scandinaves) et 10 (Lévrier) étaient rarement représentés dans notre population (respectivement 3.9% et 3%). Néanmoins, 4 races sont apparues prédominantes : les Beagles (20 chiens), les labradors (6 chiens), les bergers allemands (5 chiens) et les bergers australiens (5 chiens).

De plus, seulement 16.6% des chiens étudiés ont été qualifiés par leur propriétaire de très sportifs alors que 34 chiens (22.7%) exerçaient une activité limitée. Il apparaît donc que a grande majorité des chiens (91 chiens soit 60.7 %) a eu une activité modérée. En parallèle, 48% des chiens étudiés vivaient dans une maison avec accès à un jardin et 40.7% vivaient en appartement. De plus, seulement 19.3% de la population étudiée, soit 29 chiens, a eu accès à des objets en métal, principalement une gamelle en inox.

Concernant le comportement des chiens étudiés pendant la consultation, 22 d'entre eux (14.7%) étaient contracté, 38 (25.3%) étaient agités et la majorité (60% soit 90 chiens) avaient un comportement normal.

Concernant l'alimentation, 98% des chiens mangeaient des croquettes. Parmi ces chiens mangeant principalement des croquettes, 29.9% avaient des « à côtés » et restes de table. Les trois chiens restant (2 %) mangeaient uniquement une alimentation humide ou une ration ménagère. Quant à la qualité des aliments distribués aux chiens étudiés : 72.1% d'entre eux recevaient une alimentation de type vétérinaire stricte dite « premium » (Hill's®, Royal canin®, Proplan®, Eukanuba®, Virbac®, Specific®),), le reste recevant une alimentation de grande surface (Carrefour®, Brekkies®, Friskies®, Canigou®, Frolic®, …). Parmi les chiens recevant une alimentation de type vétérinaire de haute qualité, 30.2% ont reçu des «à côtés», des restes de table et des os à ronger.

La majorité des chiens étudiés (50.7% soit 76 chiens) mangeait deux repas par jour. Seuls 12 chiens ont reçu une alimentation à volonté.

Enfin, la majorité des chiens (73.3% soit 110 chiens) présentent un BCS dit « normal » (entre 4 et 5/9), mais 30 chiens possèdent un BCS supérieur à 6/9, soit un poids réel supérieur d'environ 15% au poids idéal. Seul dix chiens était trop maigres, présentant un BCS inférieur à 3/9 soit un poids réel inférieur au poids idéal d'environ 20%.

	Effectif	Pourcentage
Sexe		
Mâles	63	42
Mâles non castrés	44	70
Mâles castrés	19	30
Femelles	87	58
Femelles non stérilisées	52	60
Femelles stérilisées	35	40
Age		
Chiots (<1an)	44	29,3
Jeunes adultes (1-3ans)	63	42
Adultes (3-8 ans)	39	26
Mature (>8ans)	4	2,7
Races		
Croisés	49	32,7
Pure race	101	67,3
Groupe 1 (chiens de bergers)	19	18,8
Groupe 2 (Pinscher, schnauzer et molossoïdes)	13	12,9
Groupe 3 (chiens de terrier)	10	9,9
Groupe 4 (Teckels)	0	0
Groupe 5 (chiens scandinaves)	4	3,9
Groupe 6 (chiens courants)	22	21,8
Groupe 7 (chiens d'arrêt)	8	7,9
Groupe 8 (Spaniels, retrievers et chiens d'eau)	9	8,9
Groupe 9 (chiens d'agrément et de compagnie)	13	12,9
Groupe 10 (Lévriers)	3	3
Activité		
Activité limitée	34	22,7
Activité modérée	91	60,7
Très sportif	25	16,6
Lieu de vie		
Maison avec jardin	72	48
Appartement	61	40,7
Chenil	17	11,3
Contact avec des objets en métal	29	19,3
Pas de contact avec du métal	121	80,7

Comportement pendant la consultation		
Contracté	22	14,7
Normal	90	60
Agité	38	25,3
Alimentation		
Croquettes	147	98
Croquettes type premium	106	72,1
Croquettes supermarche	41	27,9
Alimentation humide ou ration ménagère	3	2
Nombre de repas par jour		
1	47	31,3
2	76	50,7
3	15	10
à volonté	12	8
Eau de boisson		
Eau du robinet	141	94
Flaque, eau de pluie, puit	7	4,7
Eau de bouteille	2	1,3
Etat corporel		
Poids réél		
≤ 10 kg	42	28
10-20kg	55	36,7
20-30kg	23	15,3
30-40kg	19	12,7
>40kg	10	6,7
BCS		
de 1 à 3 : animal maigre	10	6,6
de 4 à 5 : animal normal	110	73,3
de 6 à 8 : animal en surpoids	30	20
Troubles dermatologiques		
Oui	84	56
Non	66	44
Hemolyse		
1	122	81,3
2	22	14,7
3	4	2,7
4	2	1,3

Tableau 10 : Caractéristiques épidémiologiques de la population canine étudiées

B. Analyse statistique des données

La normalité de la distribution des valeurs de la cuprémie a été testée par le test Shapiro-Wilk dans R (version 3.0.1). Une ANOVA avec 13 facteurs a été réalisé (race, intensité de la couleur, statut sexuel, BCS, lieu de vie, délai entre le prélèvement et le repas, le fait de ronger du métal, le nombre de repas par jour, l'activité, la présence d'autres animaux, l'existence d'une hémolyse et le moment du prélèvement).

II. Résultats

A. Distribution des concentrations en cuivre dans la population canine

La distribution de la concentration plasmatique de cuivre (sans transformation mathématique préalable) a été considérée comme normale (Shapiro-Wilk, p = 0.47) (Figure 19). L'intervalle de valeurs usuelles correspondant calculé avec un risque de 5% a été de [4.9 – 9.9 µmol/L] tous chiens confondus. Lorsque l'on exclut les chiens ayant des concentrations particulièrement basses (chiens nordiques et bouviers) et particulièrement hautes (type lévrier) cet intervalle de référence est de [4.95 – 9.95 µmol/L].

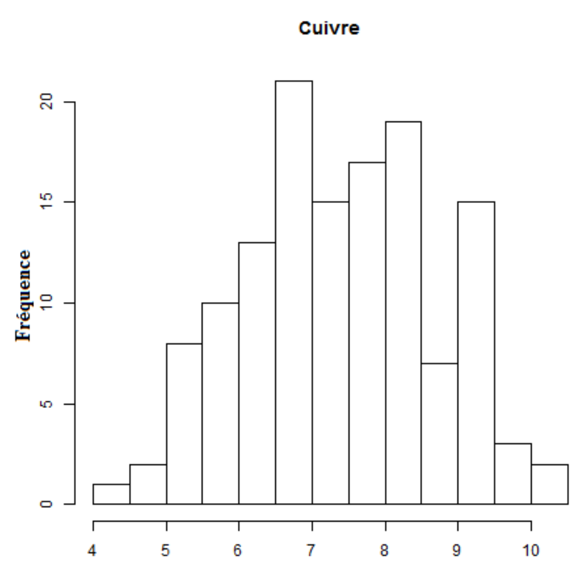


Figure 19: Répartition de la concentration en cuivre dans le plasma dans la population canine étudiée

B. Effet des facteurs épidémiologiques sur la distribution de la concentration en cuivre de la population étudiée de chiens sains

Les effets de différents facteurs biologiques exogènes ou endogènes (âge, sexe, robe, race, activité, lieu de vie, type alimentaire et BCS…) ont été étudiés sur la répartition des concentrations en cuivre dans le sang. Les résultats montrent qu'il n'existe aucune interaction entre les différents facteurs dans ce modèle.

1. L'effet de l'âge

La concentration en cuivre dépend de l'âge des chiens ($p < 0{,}001$) (Figure 20).

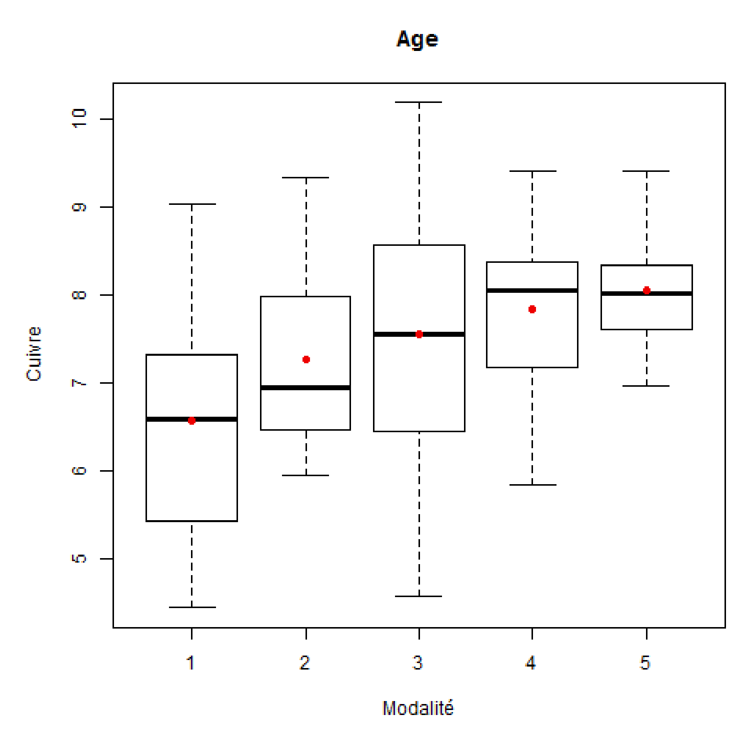


Figure 20 : Distribution de la concentration en cuivre en fonction de l'âge, dans la population canine étudiée. Groupe 1 : chiens de moins un 1 an ; groupe 2 : chiens de 1 à 2 ans ; groupe 3 : chiens de 2 à 4 ans ; groupe 4 : chiens de 4 à 6 ans ; groupe 5 : chiens de plus de 6 ans. Le point rouge correspond à la moyenne et le trait en gras à la médiane. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L.

La concentration plasmatique en cuivre est significativement plus faible chez les chiens de moins de un an (groupe 1) que chez les chiens des groupes 3, 4 et 5 (adultes de plus de 2 ans)

2. L'effet de la race

La race apparait comme un facteur de variation significatif de la concentration en cuivre (p < 0,01) (Figure 21).

Les bouviers (groupe 9) ont été exclus de l'analyse statistique car leur concentration en cuivre était anormalement basse. De même les lévriers (groupe 3), étant en nombre trop faible et ayant des concentrations plasmatiques en cuivre très élevées, ont été exclus.

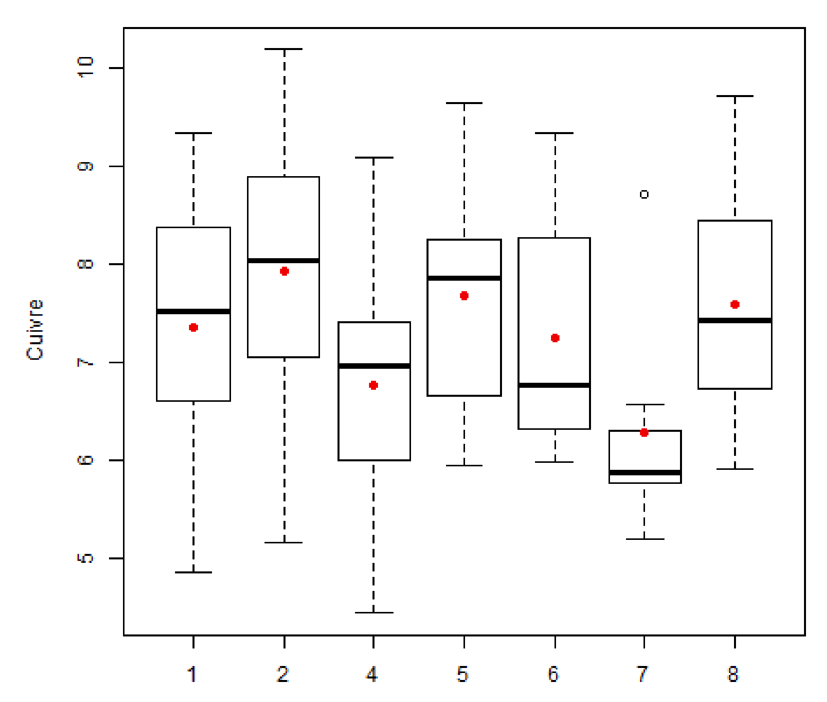


Figure 21: Distribution de la concentration en cuivre en fonction de la race, dans la population canine étudiée. Groupe 1 : bergers ; groupe 2 : terriers et chiens de moins de 10kg ; groupe 3 : lévriers (exclus) ; groupe 4 : molossoïdes ; groupe 5 : beagles ; groupe 6 chiens de chasse ; groupe 7 : chiens nordiques ; groupe 8 : bouledogues boxers dogues ; groupe 9 : bouviers (exclus). Le point rouge correspond à la moyenne et le trait en gras à la médiane. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L.

La concentration plasmatique en cuivre est significativement plus faible chez les molossoïdes que chez les terriers et chiens de moins de 10 kg (p < 0.01). De plus, elle a tendance à être plus élevé chez les terriers et chiens de moins de 10kg que chez les chiens nordiques (p < 0.05). Le groupe des molossoïdes comprend les labradors, golden retrievers, les rottweilers, les American Staffordshire, les Sharpei, les St Bernard et les Rhodesian ridgeback.

3. Le sexe et la stérilisation

La cuprémie dépend du statut sexuel (sexe et existence ou non d'une stérilisation) (p < 0,01). Elle est significativement plus élevée chez les femelles que chez les mâles entiers (p< 0.05)(Figure 22).

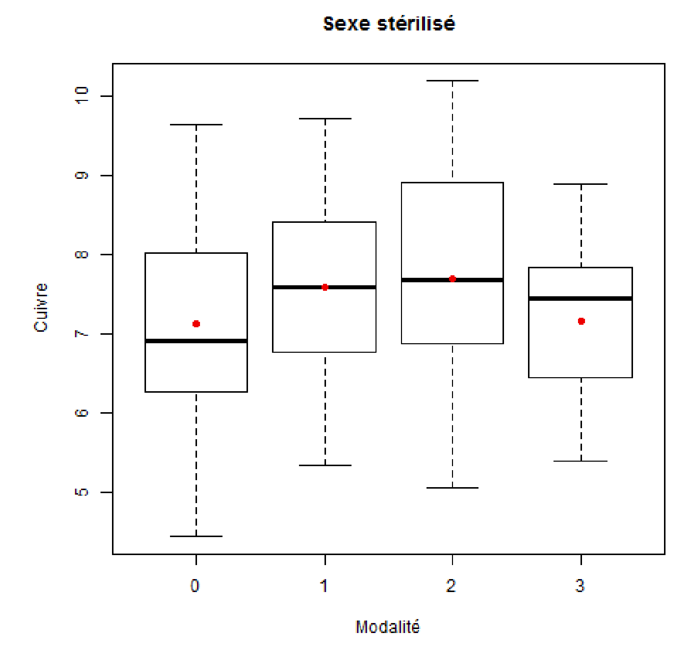


Figure 22: Distribution de la concentration en cuivre en fonction de l'état sexuel dans la population canine étudiée. Groupe 0 : mâle entier ; groupe 1 : mâle castré ; groupe 2 : femelle non stérilisée ; groupe 3 : femelle stérilisée. Le point rouge correspond à la moyenne et le trait en gras à la médiane. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L.

4. Autres facteurs

Les autres facteurs étudiés n'ont aucun effet significatif sur la concentration en cuivre dans le plasma, chez le chien.

C. Effet des facteurs pré-analytiques sur la distribution de la concentration en cuivre de la population étudiée de chiens sains

Le moment du dernier repas et l'heure du prélèvement n'ont eu aucun effet sur la concentration en cuivre dans le sang.

L'hémolyse n'a pas d'influence significative sur la cuprémie (Figure 22).

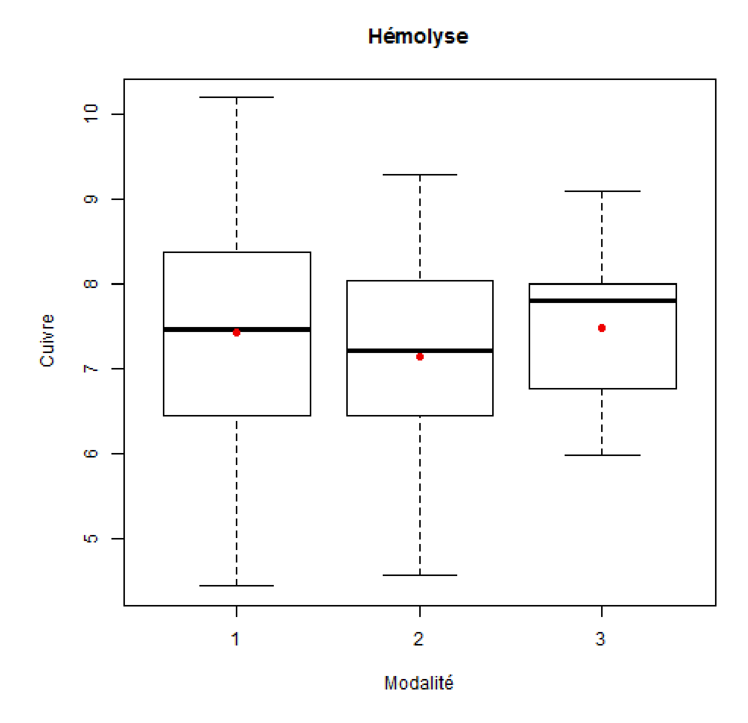


Figure 23: Distribution de la concentration en cuivre en fonction du taux d'hémolyse des tubes, dans la population canine étudiée. Groupe 1 : taux d'hémolyse 1 ; groupe 2 : taux d'hémolyse 2 ; groupe 3 : taux d'hémolyse 3 et 4. Le point rouge correspond à la moyenne et le trait en gras à la médiane. La concentration en cuivre est exprimée en µmol/L.

III. Discussion

De rares études se sont intéressées à la concentration en cuivre et à ses variations dans des populations canines présentant un caractère épidémiologique commun : la race (106, 107), le mode de vie (106, 107, 108). Cependant, ces études ont été réalisées sur des populations de chiens dédiées à l'expérimentation, ou sur des populations de chiens appartenant à une seule race. Notre étude a la particularité d'être réalisée sur une population de chiens sains, épidémiologiquement hétérogène mais représentative de la population canine en général. Notre unique critère d'inclusion pour les chiens de cette étude ayant été un état clinique apparemment sain suite à un examen clinique rigoureux, de nombreuses races et de nombreux âges sont alors représentés ; les chiens ne reçoivent pas tous la même alimentation et ils vivent dans des conditions non similaires, contrairement aux études réalisées précédemment. Cependant, certains biais inhérents à l'échantillonnage des animaux dans cette étude peuvent être présents.

A. Caractères épidémiologiques, biais éventuels

Dans notre population, 40% des femelles et 30% des mâles étaient stérilisées, contre 40% des femelles et 19% des mâles dans les références nationales françaises (d'après l'enquête Facco/Sofres de 2008). Cette proportion relativement élevée de sujets stérilisés chez les mâles proviens probablement du fait que une grande partie des chiens prélevés appartenaient à des étudiants vétérinaires, plus sensibilisés au risque d'affection prostatique et que leurs chiens, vivant en collectivité, sont plus confrontés à des problèmes comportementaux inhérents aux hormones sexuelles masculines.

De la même manière, La majorité des chiens (72.1%) recevaient une alimentation de type vétérinaire. Ce résultat semble biaisé par le fait que les étudiants vétérinaires ont des prix préférentiels sur ces différentes marques.

Une grande proportion de propriétaires (40.7%) possède un appartement, peu de chiens de chasse ou de chiens de travail sont représentés ici, l'école vétérinaire de Toulouse drainant une clientèle essentiellement urbaine.

B. La concentration en cuivre

1. Valeurs usuelles de la concentration en cuivre chez le chien apparemment sain

La concentration plasmatique en cuivre a été déterminée au laboratoire d'alimentation de l'école vétérinaire de Toulouse par spectrométrie de flamme. Elle a varié de 4.44 à 10,18 µmol/L, d'où des valeurs usuelles comprises entre 4.9 et 9.9 µmol/L. Ces valeurs diffèrent de celles trouvées dans la littérature :

Dans les études [106-107], réalisées sur 800 beagles la cuprémie est de 10 à 13.3 µmol/L. Ces valeurs sont bien plus élevées que celle trouvées chez les beagles de notre étude (allant de 5.95 à 9.63 µmol/L avec 7.68 µmol/L de moyenne). Ces valeurs ayant étaient obtenue en dosant le cuivre dans le sérum, on s'attendrait au contraire, à obtenir des valeurs plus élevées dans le plasma que dans le sérum, à cause de la ségrégation de cuivre dans le caillot sanguin [51,68]. La méthode de dosage utilisées dans ces études et la notre est identique. Nous n'avons pas d'explication à cette différence. Les chiens étudiés précédemment étaient réalisées sur des beagles, vivants en chenil dans des conditions identiques. Il est possible que le lieu de vie ou les modes d'alimentation aient influencé les concentrations usuelles en cuivre.

Dans l'étude [105], réalisée sur des chiens non sains mais sans problème sérieux, la concentration usuelle en cuivre était comprise entre 2.87 à 7.23 µmol/L. Ces résultats sont à l'inverse plus faibles que ceux observés dans notre étude, mais ces dosages avaient été réalisés sur du sérum où il est logique d'avoir des concentrations plus faibles [51,68].

2. Effet des critères épidémiologiques sur la cuprémie

➢ *L'âge*

Il apparait dans notre étude que la concentration plasmatique en cuivre est plus faible chez les chiots de moins de 1 an que chez les adultes. Ces résultats concordent avec ceux vu précédemment chez le beagle, dans lesquels ont observe une augmentation de 20% de la concentration en cuivre dans le sang chez le chien entre 2.5 et 5 ans [107].

Les besoins en cuivre augmentent durant la croissance, il est possible qu'il soit ainsi consommé en plus grande quantité lors de cette période. Durant les premiers mois de vie, le chiot consomme ses réserves cupriques et met plusieurs mois par la suite pour reconstituer ses réserves [77].

Il est donc impératif de considérer l'âge du chien lors de l'interprétation d'une concentration en cuivre.

➢ *Le sexe*

La concentration en cuivre chez le chien est plus élevée chez les femelles que chez les mâles. Ce fait a largement était démontré et étudié chez l'homme [63,84,85,72]. On remarque également qu'il n'y a pas de différences significatives entre la cuprémie chez la chienne stérilisée et chez le mâle, ce qui nous laisse supposé que, par un mécanisme similaire à celui rencontré chez l'homme, les hormones sexuelles féminines (l'oestradiol) entrainent une augmentation de la quantité de cuivre dans le sang.

Ces résultats sont cependant en contradiction avec ceux obtenus sur des beagles [106]. Lors de cette étude 800 beagles avaient étaient prélevés. La concentration en cuivre était plus élevée chez les mâles que chez les femelles. De plus, lors de cette étude, une différence entre la concentration plasmatique en cuivre chez le mâle entier et chez le mâle castré avait été mise en évidence. Nous ne retrouvons pas cela avec, au contraire, une tendance non significative à l'augmentation. Nous n'expliquons pas cette différence.

➢ *La race*

La race semble avoir un impact important sur la concentration en cuivre dans le sang chez le chien. Cela avait déjà été mis en évidence lors d'une précédente étude [108]. Il est important de noté que certaines races tels que les bouviers présentent des concentrations cuprique très basse à l'opposé des lévriers qui ont des concentrations très élevées.

Ces différences là ne s'expliquent à priori pas par la différence d'activité, ce paramètre n'ayant pas montré de variation significative de la concentration en cuivre dans notre étude.

- *L'hémolyse*

L'hémolyse n'influence pas les résultats du dosage de la concentration en cuivre par spectrométrie d'absorption, comme de précédentes études l'avaient laissé supposé [106,107].

Lors de cette expérience, les tubes n'ont été que faiblement hémolysés, avec une note d'hémolyse de moins de 4. Or, nous avons vu précédemment que la majorité du cuivre se trouve dans le plasma et qu'une très faible quantité, liée à la SOD, se retrouve dans les globules rouges [5,32-33]. Il est donc logique que la lyse d'une partie des globules rouges ne libère pas une quantité de cuivre suffisante pour modifier les résultats des dosages.

CONCLUSION

Le cuivre est un métal essentiel à la vie, un oligo-élément. Il est apporté à l'organisme par l'alimentation et est éliminé par la bile. Son métabolisme est finement régulé ce qui entraine une concentration dans le sang en cuivre assez stable, bien que variable d'un individu à l'autre. De nombreux facteurs de variations ont été identifiés bien que tous les mécanismes d'action n'ont pas été décryptés.

Nous avons ici montré que la méthode de conservation, le temps de latence entre le prélèvement et la centrifugation, l'hémolyse et la méthode de centrifugation n'ont pas d'influence sur le dosage du cuivre par spectrométrie d'absorption.

Notre étude a permis de définir des valeurs usuelles de la cuprémie chez le chien sain, ainsi que de mettre en relief certains facteurs de variations déjà identifiés dans différentes études. Cependant, les résultats sont variables d'une étude à l'autre, sans que nous ayons pu trouver d'explication à cela. La concentration en cuivre est plus faible chez les chiots de moins de un an que chez les adultes, vraisemblablement à cause des besoins augmentés lors de la croissance. De plus, comme chez l'Homme, il semblerait que les hormones sexuelles féminines jouent un rôle dans le métabolisme du cuivre, entrainant des concentrations en cuivre plus élevées chez les femelles que chez les mâles. Enfin, la concentration en cuivre est variable d'une race à l'autre. Les autres facteurs épidémiologiques tels que l'activité physique, la couleur de la robe, le BCS, le lieu de vie, le moment du dernier repas ou encore le contact avec des objets métalliques, n'ont pas d'influence sur la concentration en cuivre.

Nous avons aussi mis en évidence des points de variations qu'il sera intéressant d'explorer, comme les concentrations plus faibles en cuivre chez le jeune, ou dans certaines races comme les chiens nordiques et les bouviers bernois. D'autres études devront venir compléter notre travail expérimental, en vue de confirmer ou non les différences de cuprémie très différentes dans ces races, car l'effectif de chiens de notre population était insuffisant pour conclure.

ANNEXES

Annexe 1 : **Questionnaire ayant été rempli par tous les propriétaires de chien**

Prélèvement

Date : Heure :	Race :
Age :	Robe :
Etiquette du chien Code Postal :	Sexe ☐ F ☐ M Stérilisé(e) ? ☐ Oui ☐ Non Depuis quand ? ☐ Contraceptif Lesquels :

Etat corporel

BCS (/9) :	Poids réel :	Poids idéal estimé :

Mode de vie

☐ Appartement ☐ Maison avec jardin ☐ Maison avec jardin + sorties extérieures ☐ Autre : Vit avec d'autres animaux (si oui lesquels ?) :	Activité : ☐ Calme ☐ Actif ☐ Très actif / sportif (Agility, troupeau,chasse régulière) Remarques éventuelles :

Alimentation (cocher plusieurs cases si vous mélangez)

Moment du dernier repas :

☐ Croquettes : Nom précis : Quantité (en grammes) :	☐ Alimentation humide : Boite Barquette Sachets Nom précis : Quantité :
☐ Ration ménagère (préparation à la maison), ingrédients : Quantité :	Eau : ☐ Robinet ☐ Puits ☐ Bouteille (précisez marque)

<table>
<tr><td colspan="2">Friandises, lesquelles ?</td><td>Autre remarque ?</td></tr>
<tr><td colspan="3">Nombre de repas ☐1 ☐2 ☐ ☐volonté</td></tr>
<tr><td colspan="3">Votre animal ronge t-il, lèche t-il, ou joue t-il avec des objets en métal (jouets, gamelle) ?
Précisez :</td></tr>
<tr><td colspan="3">Antécédents médicaux</td></tr>
<tr><td colspan="3">Date de la dernière vermifugation :
Produit utilisé :</td></tr>
<tr><td colspan="3">L’animal présente t’il :</td></tr>
<tr><td>☐Des modifications du pelage :
○Poil terne
○Poil noir devenu roux
○Poil laineux
○Autre, précisez :</td><td>☐Des anomalies de pigmentation de la peau :
○Défaut de pigmentation
○Décoloration de la truffe
○Hyperpigmentation
○Autre, précisez :</td><td>☐ D’autres signes dermatologiques:
○Squames
○Plaques érythémateuses
○Epaississement de la peau
○Autre, précisez :</td></tr>
<tr><td colspan="3">Précisez la date d’apparition :</td></tr>
</table>

Prélèvement sur tube hépariné **plein de 4 mL**

A ne pas remplir par le propriétaire :
Etat d’agitation de l’animal :

☐ Animal craintif, figé, contracté
☐Animal normal
☐Animal agité, excité, hyper-mobile

Date et Heure de centrifugation :
Temps entre le prélèvement et la centrifugation
Hémolyse ?

☐ Non ☐Oui , n° :

Autre remarque ?

<u>Annexe 2 :</u> **Mode d'emploi du dosage en cuivre à l'ENVT**

<u>Dosage du cuivre et du zinc dans le plasma</u>
(méthode Lamand modifiée *)

Principe

Le dosage des oligo-éléments se fait sur le plasma (le cas échéant sur le sérum).
Après précipitation des protéines par l'acide chlorhydrique, on dose le cuivre et le zinc par spectrophotométrie d'absorption atomique sur le plasma dilué au 1/4.5ème dans de l'eau distillée.

Préparation des échantillons

1. Prélèvement

Le sang est prélevé à l'aiguille inox par écoulement sur tube plastique chimiquement propre et sec avec 2 gouttes d'héparine liquide (5000 UI/ml) ou cristallisée.

Le tube est retourné 1 à 2 fois pour bien mélanger l'héparine au sang puis centrifugé sur place (dans le meilleur des cas) ou le plus rapidement possible après conservation du tube sur bain de glace (1 heure maximum).

2. Centrifugation et récupération

- 15 minutes à 1500 g
- 12 minutes à 2500 g
- 08 minutes à 3000 g

Après centrifugation, pipeter le plasma sans reprendre d'hématies et conserver au réfrigérateur.

<u>Remarques</u> :

- 10 ml de sang total correspondent à 3 à 5 ml de plasma après centrifugation.
- Les hématies contenant 5 fois plus de zinc que le plasma, toute hémolyse compromet l'interprétation du zinc plasmatique. Attention au laminage lors du prélèvement ou à la présence d'eau.
- La conservation du plasma se fait au réfrigérateur et non au congélateur.

Réactifs

- HCl 3N (diluer 250 ml HCl concentré (d=1.18 ; 37 %) qsp 1 l H_2O distillée)
- Eau distillée
- Solutions mères de cuivre et de zinc à 1 g/L solutions standard CertiPUR Merck. :

Cuivre solution étalon Cu $(NO_3)_2$ dans HNO_3 0.5 mol/l 500 ml ref 1.19786.0500
Zinc solution étalon Zn $(NO_3)_2$ dans HNO_3 0.5 mol/l 500 ml ref 1.19806.0500

Matériel

- Tubes polypropylène 5 ml et bouchons
- Vortex
- Centrifugeuse
- Micropipettes et pipette multidistribution
- Embouts jetables

Mode opératoire

1. Préparation des échantillons

Homogénéiser les échantillons bruts par retournement doux (si des hématies sont présentes en culot, laisser re-sédimenter quelques minutes).

Prélever 1 ml d'échantillon à la pipette dans un tube sec de 5 ml et rajouter 0.5 ml d'HCl 3N.

Agiter au vortex vitesse maximum de 5 à 10 secondes pour disperser le coagulat au maximum.

Laisser précipiter 10 minutes.

Compléter à 4. 5 ml en rajoutant 3 ml d'eau distillée, boucher, agiter fortement à la main pour disperser le plus possible les éventuels « grumeaux ».

Centrifuger 15 minutes à 4000 tours/min à température ambiante. Le dosage se fera sur le surnageant en évitant d'aspirer le culot.

Remarque : Si le dosage doit être différé, laisser les échantillons préparés à température ambiante.

2. Gamme étalon commune

Solution fille commune

A partir des solutions mères à 1 g/l, préparer la solution fille commune Zn/Cu à 10 mg/l en introduisant 1 ml de chaque solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml et en complétant avec de l'eau distillée.

Cette solution fille est stable pendant au moins un mois à température ambiante.

Points de gamme

Pipeter successivement 1 ; 2.5 ; 5 ; 7.5 ml de solution fille commune dans 4 fioles jaugées de 100 ml. Rajouter 10 ml d'HCl 3 N et ajuster à l'eau distillée. Réaliser une fiole pour le blanc avec seulement 10 ml HCl 3 N et de l'eau distillée ;

On a donc les points de gamme correspondants :

Pour le Zn : 1.53 ; 3.82 ; 7.65 ; 11.47 µmoles/l
Soit : 0.1 ; 0.25 ; 0.50 ; 0.75 mg/l
de zinc et de cuivre
Pour le Cu : 1.57 ; 3.93 ; 7.87 ; 11.77 µmoles/l

Mesures

L'appareil actuellement en service est le spectrophotomètre d'absorption atomique SOLAAR AA Series version 9.12 couplé au passeur CETAC ASX 510.
Les absorbances des échantillons sont reportées sur la courbe étalon réalisée par l'appareil aux gammes étalons. Les valeurs sont corrigées par le facteur de dilution (ici 4.5)
Les valeurs habituelles du cuivre et du zinc plasmatiques pour les bovins sont comprises entre 12.60 et 18.90 µmoles/l soit 80 à 120 µg/100 l. La limite de carence est fixée à 11 µmoles/l soit 70 µg/100 l
(Valeurs indiquées par Lamand (INRA- Theix) 1975

Conditions de mesures

(voir aussi rapports Solaar « Paramètres » et « Etalonnage »)

Réglages	**Zn**	**Cu**
Flamme	Air /acétylène	
	Pauvre/oxydante (excès de comburant (O2 de l'air))	
Brûleur	100 mm	
Débit acétylène	0.9 à 1.2 l/min	0.8 à 1.1 l/min
Longueur d'onde	213.9 nm	324.8 nm
Courant de lampe	75%	
Bande passante	0.5 nm	
Correction de fond	D2 quadline	

* Lamand M. (1972) : Diagnostic en oligo-éléments chez l'animal. Ann. Nutr.alim., 26(2), B379-B410.

NB :

Dans la méthode officielle du dosage du cuivre dans le sérum (AOAC 983.24), les échantillons sont dilués au ½ avec de l'eau et les solutions de travail d'étalonnage sont préparées avec du glycérol à 10%. Pour le zinc (AOAC 991.11), les échantillons sont dilués au 1/5ème et la matrice commune échantillons-gamme contient 0.03% de Brij 35.

BIBLIOGRAPHIE

1. La Fontaine, S., J.F. Mercer, *Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis.* Arch Biochem Biophys, 2007. **463**(2): p. 149-67.
2. Wapnir, R.A., *Copper absorption and bioavailability.* Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1054S-1060S.
3. Moller, L.B., Carsten Petersen B., Connie Lund A., Nina Horn., *Characterization of the hCTR1 gene: genomic organization, functional expression, and identification of a highly homologous processed gene.* Gene, 2000. **257**(1): p. 13-22.
4. Pena, M.M., J. Lee, D.J. Thiele, *A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution.* J Nutr, 1999. **129**(7): p. 1251-60.
5. Tapiero, H., D.M. Townsend, and K.D. Tew, *Trace elements in human physiology and pathology. Copper.* Biomed Pharmacother, 2003. **57**(9): p. 386-98.
6. Arredondo, M., Munoz P., Mura C.V., Nunez M.T., *DMT1, a physiologically relevant apical Cu1+ transporter of intestinal cells.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(6): p. C1525-30.
7. I. Bertini, A.R., *Menkes disease.* Cellular and molecular Life Sciences, 2008. **65**: p. 89-91.
8. Puig, S., D.J. Thiele, *Molecular mechanisms of copper uptake and distribution.* Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(2): p. 171-80.
9. Garcia Hejl, C., Vrignaud C, Garcia C, Ceppa F. *[From gene to disease: copper-transporting P ATPases alteration].* Pathol Biol (Paris), 2009. **57**(3): p. 272-9.
10. Fieten, H., Leegwater P.A.J., Watson A.L., Rothuizen J., *Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism.* Mamm Genome, 2011. **23**(1-2): p. 62-75.
11. Vonk, W.I., C. Wijmenga, B. van de Sluis, *Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis.* Am J Clin Nutr, 2008. **88**(3): p. 840S-5S.
12. Linder, M.C., M. Hazegh-Azam, *Copper biochemistry and molecular biology.* Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 797S-811S.
13. Askwith, C., J. Kaplan, *Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease.* Trends Biochem Sci, 1998. **23**(4): p. 135-8.
14. Portnoy ME, S.P., Rogers RS, Culotta VC., *Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in Saccharomyces* Mol Genet Genomics, 2001. **265**: p. 873-882.
15. Freedman, J.H., M.R. Ciriolo, J. Peisach, *The role of glutathione in copper metabolism and toxicity.* J Biol Chem, 1989. **264**(10): p. 5598-605.
16. Bertinato, J., M.R. L'Abbe, *Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload.* J Nutr Biochem, 2004. **15**(6): p. 316-22.
17. Rae, T.D., Schmidt P. J., Pufahl R. A., Culotta V. C., O'Halloran T. V., *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase.* Science, 1999. **284**(5415): p. 805-8.
18. Klomp, L.W., Lin S.J., Yuan D.S., Klausner R.D., Cizewski Culotta V., Gitlin J.D., *Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis.* J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9221-6.

19. Linz, R., S. Lutsenko, *Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins.* J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(5-6): p. 403-7.
20. S. Lutsenko, M.J.P., *Fonction and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: Insights from biochemical and cell biological approaches.* The journal of Membrane biology, 2002. **191**: p. 1-12.
21. Hellman, N.E., Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD. *Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin.* J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46632-8.
22. Sato, M., J.D. Gitlin, *Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin.* J Biol Chem, 1991. **266**(8): p. 5128-34.
23. Wirth, P.L., M.C. Linder, *Distribution of copper among components of human serum.* J Natl Cancer Inst, 1985. **75**(2): p. 277-84.
24. Babic, Z., Tariba B., Kovačić J., Pizent A., Varnai V.M., Macan J., *Relevance of serum copper elevation induced by oral contraceptives: a meta-analysis.* Contraception, 2012.
25. Camakaris, J., I. Voskoboinik, J.F. Mercer, *Molecular mechanisms of copper homeostasis.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(2): p. 225-32.
26. Linder, M.C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R., Lomeli N., *Copper transport.* Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5 Suppl): p. 965S-971S.
27. Meyer, L.A., Durley A.P., Prohaska J.R., Harris Z.L., *Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36857-61.
28. Holtzman, N.A., B.M. Gaumnitz, *Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in rat plasma.* J Biol Chem, 1970. **245**(9): p. 2354-8.
29. Harris, Z.L., L.W. Klomp, J.D. Gitlin, *Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis.* Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5 Suppl): p. 972S-977S.
30. Harris, Z.L., J.D. Gitlin, *Genetic and molecular basis for copper toxicity.* Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 836S-41S.
31. Kunihito terada, Y.k., *copper incorporation into ceruloplasmin in rat liver.* Biochimica et Biophysica acta, 1995. **1270**: p. 58-62.
32. Bureau, I., Anderson R.A., Arnaud J., Raysiguier Y., Favier A.E., Rousse A.M., *Trace mineral status in post menopausal women: impact of hormonal replacement therapy.* J Trace Elem Med Biol, 2002. **16**(1): p. 9-13.
33. Iyengar, V., J. Woittiez, *Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values.* Clin Chem, 1988. **34**(3): p. 474-81.
34. McMillin, G.A., J.J. Travis, J.W. Hunt, *Direct measurement of free copper in serum or plasma ultrafiltrate.* Am J Clin Pathol, 2009. **131**(2): p. 160-5.
35. Wijmenga, C., L.W. Klomp, *Molecular regulation of copper excretion in the liver.* Proc Nutr Soc, 2004. **63**(1): p. 31-9.
36. Tavassoli, M., T. Kishimoto, M. Kataoka, *Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin.* J Cell Biol, 1986. **102**(4): p. 1298-303.
37. Cater, M.A., La Fontaine J.F.B., *ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion.* Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 493-506.
38. KO, L., *The nature of the copper complexes in bile and their relationship to the absorption and excretion of copper in normal subjects and in Wilson's disease.* Gut, 1973. **14**: p. 221-232.

39. Trocello, *Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte.* La revue de médecine interne, 2010.
40. Petris, M.J., Smith K., Lee J., Thiele D.J., *Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1.* J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9639-46.
41. Labbe, S., D.J. Thiele, *Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast.* Trends Microbiol, 1999. **7**(12): p. 500-5.
42. Balamurugan, K., W. Schaffner, *Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(7): p. 737-46.
43. Coyle, P., Philcoxa J. C., Careya L. C., Rofea B., A.M.**,** *Metallothionein: the multipurpose protein.* Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(4): p. 627-47.
44. Durnam, D.M., R.D. Palmiter, *Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals.* J Biol Chem, 1981. **256**(11): p. 5712-6.
45. Vanderwerf, S.M., Cooper M.J., Stetsenko I.V., Lutsenko S., *Copper specifically regulates intracellular phosphorylation of the Wilson's disease protein, a human copper-transporting ATPase.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36289-94.
46. Petris, M.J., Mercer J.F.B., Culvenor J.G., Lockhart P., Gleeson P.A., Camakaris J. *Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking.* EMBO J, 1996. **15**(22): p. 6084-95.
47. Louro, M.O., J.A. Cocho, J.C. Tutor, *Assessment of copper status in pregnancy by means of determining the specific oxidase activity of ceruloplasmin.* Clin Chim Acta, 2001. **312**(1-2): p. 123-7.
48. Platonova, N., Guolikhandanovac N., Tsymbalenkoa N., Zhigulevaa E., Zhivulkoc T., Vasinc A., Evsukovad I., Puchkovaa L.,_*Milk ceruloplasmin is a valuable source of nutrient copper ions for mammalian newborns.* J Trace Elem Med Biol, 2007. **21**(3): p. 184-93.
49. L. Wooten, R.A.S., R.W. Lancey, M. Lietzow, M.C. Linder, *Ceruloplasmin is found in milk and amniotic fluid and may have a nutritional role.* Nutritional Biochemistry, 1996. **7**: p. 632-639.
50. Lonnerdal, B., *Bioavailability of copper.* Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 821S-9S.
51. R.A.Laven, C.T.L., *An evaluation of the effect of clotting on the relationship between copper and ceruloplasmin in bovine blood.* The veterinary journal, 2007. **174**: p. 400-402.
52. Hsiung, C.S., Andrade JD, Costa R, Ash KO. *Minimizing interferences in the quantitative multielement analysis of trace elements in biological fluids by inductively coupled plasma mass spectrometry.* Clin Chem, 1997. **43**(12): p. 2303-11.
53. Faa, G., Nurchi V., Demelia L., Ambu R., Parodo’ G., Congiu’ T., Sciot R., Eyken P.V, Silvagni R., Crisponi G., *Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease.* J Hepatol, 1995. **22**(3): p. 303-8.
54. K. Sreenivasa Rao, T.B., T. Prasada Rao, Y. Babu, G.R.K Naidu, *Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry.* Spectrochimica acta Part B, 2002. **57**: p. 1333-1338.
55. Rodrigues JL, B.B., Nunes JA, Passos CJ, Barbosa F Jr., *Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements.* Science of the total environment, 2008. **405**: p. 370-376.
56. W.Wasiak, W.C., A. Ciszewski, *Hair analysis. Part1: Differentiel pulse anodic stripping voltammetric determination of lead, cadmium, zinc and copper in human hair samples of*

persons in permanent contact with a polluted workplace environment. Analytica chimica acta, 1996. **335**: p. 201-207.
57. Vir, S.C., A.H. Love, W. Thompson, *Serum and hair concentrations of copper during pregnancy.* Am J Clin Nutr, 1981. **34**(11): p. 2382-8.
58. Brewer, G.J., *Wilson disease and canine copper toxicosis.* Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1087S-1090S.
59. Turnlund, J.R., Keyes W.R., Anderson H.L., Acord L.L*., Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope 65Cu.* Am J Clin Nutr, 1989. **49**(5): p. 870-8.
60. Carruthers, M.E., C.B. Hobbs, R.L. Warren, *Raised serum copper and caeruloplasmin levels in subjects taking oral contraceptives.* J Clin Pathol, 1966. **19**(5): p. 498-500.
61. Aceto, M., Abollinoz O., Concetta Bruzzoniti M., Ment Mentastiz E.,
Sarzaniniz C. , Malandrinoz M., *Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review.* Food Addit Contam, 2002. **19**(2): p. 126-33.
62. J.M. Jurado, L.J.M., F. Pablos, A. Moreda-pineiro, P. Bermejo-barrera, *Direct determination of copper, lead and cadmium in aniseed spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry.* Food chemistry, 2007. **101**: p. 1296-1304.
63. Forrer, R., K. Gautschi, H. Lutz, *Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS.* Biol Trace Elem Res, 2001. **80**(1): p. 77-93.
64. Parker, M.M., F.L. Humoller, D.J. Mahler, *Determination of copper and zinc in biological material.* Clin Chem, 1967. **13**(1): p. 40-8.
65. Meret, S., R.I. Henkin, *Simultaneous direct estimation by atomic absorption spectrophotometry of copper and zinc in serum, urine, and cerebrospinal fluid.* Clin Chem, 1971. **17**(5): p. 369-73.
66. Schmitt, Y., *Influence of preanalytical factors on the atomic absorption spectrometry determination of trace elements in biological samples.* J Trace Elem Electrolytes Health Dis, 1987. **1**(2): p. 107-14.
67. Spolders, M., Ohlschläger S, Rehage J, Flachowsky G. *Inter- and intra-individual differences in serum copper and zinc concentrations after feeding different amounts of copper and zinc over two lactations.* J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2008. **94**(2): p. 162-73.
68. Laven, R.A., C.T. Livesey, *An evaluation of the effect of clotting and processing of blood samples on the recovery of copper from bovine blood.* Vet J, 2006. **171**(2): p. 295-300.
69. Sternlieb, I., H.D. Janowitz, *Absorption of Copper in Malabsorption Syndromes.* J Clin Invest, 1964. **43**: p. 1049-55.
70. O. lux, D.n., *The assessment of biological variation components of copper, zinc and selenium.* Journal of Nutritional biochemistry, 1995. **6**: p. 43-47.
71. Lahey, M.E., C. J. Gubler, G. E. Cartwright, M. M. Wintrobe *Studies on copper metabolism. VI. Blood copper in normal human subjects.* J Clin Invest, 1953. **32**(4): p. 322-8.
72. Sanchez, C., López-Jurado M., Aranda P., Llopis J., *Plasma levels of copper, manganese and selenium in an adult population in southern Spain: influence of age, obesity and lifestyle factors.* Sci Total Environ, 2010. **408**(5): p. 1014-20.
73. Sandstead, H.H., *Copper bioavailability and requirements.* Am J Clin Nutr, 1982. **35**(4): p. 809-14.
74. M. Fields, M.D.L., C.G. Lewis, *Effect of satured versus unsaturated fat on the pathogenesis of copper deficiency in rats.* Nutritional Biochemistry, 1996. **7**: p. 246-251.

75. Drews, L.M., C. Kies, H.M. Fox, *Effect of dietary fiber on copper, zinc, and magnesium utilization by adolescent boys.* Am J Clin Nutr, 1979. **32**(9): p. 1893-7.
76. Turnlund, J.R., Keyes W.R., Peiffer G.L., Karen C Scott K.C., *Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope 65Cu.* Am J Clin Nutr, 1998. **67**(6): p. 1219-25.
77. Beshgetoor, D., M. Hambidge, *Clinical conditions altering copper metabolism in humans.* Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1017S-1021S.
78. Abdel-Mageed AB, O.F., *The effect of various dietary zinc concentrations on the biological interactions of zinc, copper, and iron in rats.* Biological trace elements research, 1991. **29**: p. 239-256.
79. Fischer, P.W., A. Giroux, M.R. L'Abbe, *The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption.* Am J Clin Nutr, 1981. **34**(9): p. 1670-5.
80. Speich, M., A. Pineau, F. Ballereau, *Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity.* Clin Chim Acta, 2001. **312**(1-2): p. 1-11.
81. Storey, M.L., J.L. Greger, *Iron, zinc and copper interactions: chronic versus acute responses of rats.* J Nutr, 1987. **117**(8): p. 1434-42.
82. R.A.Wapnir, G.D., C. Vaquero solans, *Inhibition of intestinal copper absorption by divalent cations and low-molecular-weight ligands in the rat.* Biological Trace Element Research, 1993. **36**: p. 291-305.
83. Van Campen, D., E. Gross, *Influence of ascorbic acid on the absorption of copper by rats.* J Nutr, 1968. **95**(4): p. 617-22.
84. Milne, D.B., P.E. Johnson, *Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults.* Clin Chem, 1993. **39**(5): p. 883-7.
85. Rodriguez, E., C. Diaz, *Iron, copper and zinc levels in urine: relationship to various individual factors.* J Trace Elem Med Biol, 1995. **9**(4): p. 200-9.
86. F. Kamp, T.R., CM. Donangelo, *Effect of oral contraceptive use and zinc supplementation on zinc, iron and copper biochemical indices in young women.* The european e-journal of clinical nutrition and metabolism, 2011. **6**: p. 253-258.
87. Benes, B., Spěváčková V., Šmíd J., Batáriová A., Čejchanová M., Zítková L.*, Effects of age, BMI, smoking and contraception on levels of Cu, Se and Zn in the blood of the population in the Czech Republic.* Cent Eur J Public Health, 2005. **13**(4): p. 202-7.
88. Diaz Romero, C., Hendquez Sanchez P., Lopez Blanco F., Rodriguez Rodriguez E, Serra Majem L., *Serum copper and zinc concentrations in a representative sample of the Canarian population.* J Trace Elem Med Biol, 2002. **16**(2): p. 75-81.
89. Johnson, P.E., D.B. Milne, G.I. Lykken, *Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans.* Am J Clin Nutr, 1992. **56**(5): p. 917-25.
90. Margen S, K.J., *Effect of oral contraceptive agents on the metabolism of some trace minerals.* The american journal of clinical nutrition, 1975. **28**: p. 392-402.
91. Abdulrazzaq, Y.M., Osman N, Nagelkerke N, Kosanovic M, Adem A. *Trace element composition of plasma and breast milk of well-nourished women.* J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2008. **43**(3): p. 329-34.
92. Laura Perrone MD, G.G., phD, Renata Moro, *Zinc, copper, and iron in obese children and asolescents.* Nutrition research, 1998. **18**: p. 183-189.
93. Lockitch, G., Halstead A.C., Wadsworth L., Qulgiey G., Reston L., Jacobson B., *Age- and sex-specific pediatric reference intervals and correlations for zinc, copper, selenium, iron, vitamins A and E, and related proteins.* Clin Chem, 1988. **34**(8): p. 1625-8.

94. Lifschitz, M.D., R.I. Henkin, *Circadian variation in copper and zinc in man.* J Appl Physiol, 1971. **31**(1): p. 88-92.
95. Yokoyama, K., Araki S, Sato H, Aono H. *Circadian rhythms of seven heavy metals in plasma, erythrocytes and urine in men: observation in metal workers.* Ind Health, 2000. **38**(2): p. 205-12.
96. Iyengar, V., *Presampling factors in the elemental composition of biological systems.* Analytical chemistry, 1982. **54**.
97. Atkinson, R.L., Dahms W.T., Bray G.A., Jacob R., Standtead H.H., *Plasma zinc and copper in obesity and after intestinal bypass.* Ann Intern Med, 1978. **89**(4): p. 491-3.
98. Kim OY, S.M., Moon J, Chung JH, *Plasma ceruloplasmin as a biomarker for obesity: a proteomic approach.* Clinical biochemistry, 2011. **44**: p. 351-356.
99. Rodríguez Tuya I, P.G.E., Maynar Mariño M, García-Moncó Carra RM, Sánchez Misiego A, *Evaluation of the influence of physical activity on the plasma concentrations of several trace metals.* European journal of applied physiology and occupational physiology, 1996. **73**: p. 299-303.
100. Campbell, J.D., *Lifestyle, minerals and health.* Med Hypotheses, 2001. **57**(5): p. 521-31.
101. Milne, D.B., *Assessment of copper nutritional status.* Clin Chem, 1994. **40**(8): p. 1479-84.
102. GJ, B., *Copper control as an antiangiogenic anticancer therapy: lessons from treating Wilson's disease.* Experimental biology and medecine, 2001. **226**: p. 665-673.
103. Walter, R.M., Jr., Uriu-Hare J.Y., Lewis Olin K., Oster M.H., Anawalt B.D., Critchfield J.W., Keen C.L., *Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes mellitus.* Diabetes Care, 1991. **14**(11): p. 1050-6.
104. Hamza, I., Faisst A., Prohaska J., Chen J., Gruss P., Gitlin J.D., *The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6848-52.
105. Montaser, A., C. Tetreault, M. Linder, *Comparison of copper binding components in dog serum with those in other species.* Proc Soc Exp Biol Med, 1992. **200**(3): p. 321-9.
106. Fisher, G.L., *Effects of disease on serum copper and zinc values in the Beagle.* Am J Vet Res, 1977. **38**(7): p. 935-40.
107. Keen, C.L., B. Lonnerdal, G.L. Fisher, *Seasonal variations and the effects of age on serum copper and zinc values in the dog.* Am J Vet Res, 1981. **42**(2): p. 347-50.
108. Mert, H., Mert N, Dogan I, Cellat M, Yasar S. *Element status in different breeds of dogs.* Biol Trace Elem Res, 2008. **125**(2): p. 154-9.
109. Shih, J.L., Keating J.H., Freeman L.M., Webster C.R.L., *Chronic hepatitis in Labrador Retrievers: clinical presentation and prognostic factors.* J Vet Intern Med, 2007. **21**(1): p. 33-9.
110. Van De Sluis, B., Rhotuizen J., Pearson P.L., Van oost B.A., Wijmenga C., *Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(2): p. 165-73.
111. Klomp AE, v.d.S.B., Klomp LW, Wijmenga C., *The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis.* Journal of Hepatology, 2003. **39**: p. 703-709.
112. Fieten, H., Hooijer-Nouwens BD, Biourge VC, Leegwater PA, Watson AL, van den Ingh TS, Rothuizen J. *Association of dietary copper and zinc levels with hepatic copper and zinc concentration in labrador retrievers.* J Vet Intern Med, 2012. **26**(6): p. 1274-80.

113. Kennedy, C., Angermuller S, King R, Noviello S, Walker J, Warden J, Vang S. *A comparison of hemolysis rates using intravenous catheters versus venipuncture tubes for obtaining blood samples.* J Emerg Nurs, 1996. **22**(6): p. 566-9.
114. Cox, S.R., Dages JH, Jarjoura D, Hazelett S. *Blood samples drawn from IV catheters have less hemolysis when 5-mL (vs 10-mL) collection tubes are used.* J Emerg Nurs, 2004. **30**(6): p. 529-33.
115. D.P., L., *Development and validation of a body condition score system for dogs.* Canine Practice, 1997. **22**: p. 10-15.

Toulouse, 2013

Nom: Vançon   Prénom: Solène

Titre: Le statut en oligo-élément chez le chien sain: le cuivre

Résumé : Ce travail est une étude expérimentale ayant pour but de déterminer l'intervalle de référence de la cuprémie chez le chien sain, et l'influence de facteurs épidémiologiques sur ce dernier. La population étudiée comprend 150 chiens, et est représentative de la population canine française. Chez ces individus un dosage ponctuel de la concentration plasmatique en cuivre sur tube hépariné a été réalisé. Dans ce travail il apparait que la concentration en cuivre est plus faible chez le chiot que chez l'adulte, varie entre les races et est plus élevé chez la chienne non stérilisée que chez le mâle.

Mots clefs : Cuivre, chien, spectrométrie d'absorption, plasma, facteurs épidémiologiques, âge, sexe, race

English title: The trace elements status of healthy dogs: the copper

Abstract: This work is an experimental study with aims to establish the reference interval of the concentration of copper of the healthy dog, and the effects of some epidemiological factors on this concentration. The population studied here is constituted by 150 healthy dog and is representative of french canine population. In this population single measures of plasma copper concentration were performed. The concentration of copper in blood of puppies seems to be lower than adults, and can change according to the breed, and seems to be higher on females than males.

Keywords: Copper, dog, Absorption Spectrometry, plasma, epidemiological factors, age, sex, breed